

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2991720号

(45) 発行日 平成11年(1999)12月20日

(24) 登録日 平成11年(1999)10月15日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K 16/00		C 0 7 K 16/00
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 21/00		C 1 2 P 21/00 C
21/08		21/08

請求項の数28(全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願昭63-506481	(73) 特許権者	999999999 ゾーマ・コーポレーション アメリカ合衆国94710カリフォルニア州 パークレー、セブンス・ストリート 2910番
(86) (22) 出願日	昭和63年(1988) 7 月25日	(72) 発明者	ロビンソン, ランディ・アール アメリカ合衆国カリフォルニア90045、 ロスアンジェルス、ウエスト・セブンテ ィナインス・ストリート5706番
(85) 公表番号	特表平3-501321	(72) 発明者	リウ, アルビン・ワイ アメリカ合衆国カリフォルニア90403、 サンタモニカ、エイズ・ストリート807 番、アパートメント6
(43) 公表日	平成 3 年(1991) 3 月28日	(74) 代理人	弁理士 青山 蓓 (外 1 名)
(86) 国際出願番号	P C T / U S 8 8 / 0 2 5 1 4	審査官	引地 進
(87) 国際公開番号	W O 8 9 / 0 0 9 9 9		
(87) 国際公開日	平成 1 年(1989) 2 月 9 日		
審査請求日	平成 7 年(1995) 7 月18日		
(31) 優先権主張番号	0 7 7 , 5 2 8		
(32) 優先日	1987年 7 月24日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体遺伝子のモジュールの会合、それによって製造される抗体およびその用途

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】抗体の可変領域を含んでいる免疫グロブリン鎖または抗原結合活性を有するそのフラグメントであって、該抗体の可変領域が、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントが原核生物細胞から分泌され得る様に、そのN末端に於いて原核性分泌シグナルペプチドと直接結合していることを特徴とする、該免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント。

【請求項2】免疫グロブリン軽鎖である請求項1の免疫グロブリン鎖。

【請求項3】免疫グロブリン重鎖である請求項1の免疫グロブリン鎖。

【請求項4】原核性分泌シグナルペプチドがペクチン酸リアーゼシグナルペプチドである請求項1～3のいずれかに記載の免疫グロブリン鎖。

2

【請求項5】フラグメントがF_dフラグメントである請求項1または4の免疫グロブリン鎖。

【請求項6】キメラ鎖である請求項1～5のいずれかに記載の免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント。

【請求項7】請求項1～6のいずれかに記載の免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントをコードしているポリヌクレオチド分子。

【請求項8】プロモーターを含んでいることもあるDNAである請求項7に記載の分子。

10 【請求項9】請求項7または8の分子を含んでいるベクター。

【請求項10】請求項7または8の分子を含んでいる発現ベクター。

【請求項11】免疫グロブリン鎖または抗原結合活性を有するそのフラグメントを製造する方法であって、

3

a) 原核性宿主において転写を指令し得るプロモーターを含んでいる請求項9に記載のベクターで原核性宿主を形質転換またはトランスフェクトし、

b) 可変領域がそのN末端で原核性分泌シグナルペプチドと直接結合している免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントが発現される様に該宿主を適切な条件下で培養し、

c) 宿主から分泌されるまでは該シグナルペプチドと結合していた免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントを得る、

ことからなる方法。

【請求項12】請求項1～6に記載の免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントを製造する方法であって、

a) 該免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントを発現し得る原核性宿主を培養し、

b) 培養から免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントを回収する、

ことからなる方法。

【請求項13】免疫グロブリン鎖または抗原結合活性を有するそのフラグメントを製造する方法であって、

a) 免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントが原核生物細胞から分泌され得る様に、可変領域がそのN末端に於いて原核性分泌シグナルペプチドと直接結合している該免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントをコードしているポリヌクレオチド配列の宿主中での転写の結果として該免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントが発現される様に、形質転換またはトランスフェクトされた原核性宿主を適切な条件下で培養し、

b) 宿主から分泌されるまでは該シグナルペプチドと結合していた免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントを得る、

ことからなる方法。

【請求項14】分泌シグナルペプチドがベクチン酸リアーゼシグナルペプチドである請求項11～13のいずれかに記載の方法。

【請求項15】免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントを細胞周辺腔から分離する請求項11～14のいずれかに記載の方法。

【請求項16】免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントを増殖培養培地から分離する請求項11～14のいずれかに記載の方法。

【請求項17】請求項9または10に記載のベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主。

【請求項18】ジシストロン転写単位と機能的に結合している原核性プロモーター領域を含んでいるポリヌクレオチド分子であって、該転写単位は免疫グロブリン重鎖または抗原結合活性を有するそのフラグメントと免疫グロブリン軽鎖をコードしており、該免疫グロブリン重鎖またはそのフラグメントと免疫グロブリン軽鎖はそれぞれ別々に原核性分泌シグナルペプチドと結合しているも

4

のであるポリヌクレオチド分子。

【請求項19】免疫グロブリン重鎖および軽鎖がキメラ鎖である請求項18の分子。

【請求項20】請求項18または19に記載のポリヌクレオチド分子を含み、原核性宿主中でポリヌクレオチド分子を発現することができるベクター。

【請求項21】請求項20に記載のベクターでトランスフェクトされた、免疫グロブリンを生産し得る原核性宿主。

10 【請求項22】重鎖および軽鎖またはそれらのフラグメントが会合して分子全体として所望の結合および認識特性を示す免疫グロブリン分子を製造する方法であって、

a) ポリヌクレオチド配列の転写の結果として、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖またはそのフラグメントが発現される様に、形質転換またはトランスフェクトした原核性宿主を適切な条件下で培養し、但しここで、該ポリヌクレオチド配列は少なくとも可変領域の機能的に作用する領域と原核性分泌シグナルペプチドをコードしており、かつ、発現後は宿主からの分泌を可能ならしめる様に該可変領域はそのN末端で原核性分泌シグナルペプチドと結合しているものであり、

b) 分子全体として所望の結合および認識特性を示すように重鎖および軽鎖またはそのフラグメントが会合している免疫グロブリン分子の形で、宿主から分泌されるまでは該シグナルペプチドと結合していた該免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントを得る、

ことからなる方法。

【請求項23】分泌シグナルペプチドがベクチン酸リアーゼシグナルペプチドである請求項22に記載の方法。

20 【請求項24】免疫グロブリン分子を細胞周辺腔から分離する請求項22または23に記載の方法。

【請求項25】免疫グロブリン鎖またはそのフラグメントを増殖培養培地から分離する請求項22または23に記載の方法。

【請求項26】免疫グロブリン分子がキメラ免疫グロブリン鎖を含んでいる請求項22～25のいずれかに記載の方法。

【請求項27】抗体の可変領域が免疫グロブリン鎖以外のポリペプチドをコードしている配列と機能的に結合している請求項22～25に記載の方法。

【請求項28】ポリペプチドが酵素である請求項27に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

本出願は、1985年11月1日出願の出願番号793,980の一部継続出願である1986年10月27日出願のPCT出願W087/02671の一部継続出願であり、その記載内容は引用によって本明細書に完全に含まれる。

発明の分野

本発明は、免疫グロブリンの組換えDNA製造法、それ

をコードしている遺伝子配列およびその様な配列を得るための方法に関するものである。

背景技術

コーラーおよびミルシュタイン (Kohler and Milstein) によるモノクローナル抗体の製造のための細胞-細胞融合の適用 (Nature (London), 256:495, 1975) は生物学に革命を起こし、組換えDNAクローニングの発明に影響を与えた。ハイブリドマによって産生されたモノクローナル抗体は、臨床診断および基礎的科学研究において既に広範に使用されている。ヒトB細胞ハイブリドマ産生性モノクローナル抗体の適用は、癌、ウイルスおよび微生物感染症、抗体産生の低下したB細胞免疫不全、および免疫系のその他の疾患および障害の臨床治療のために非常に有望である。

残念ながら、ヒトハイブリドマセルラインからのモノクローナル抗体の収量は比較的低く (マウスハイブリドマでは100 μ g/mlであるのに比較し、ヒトxヒトでは1 μ g/ml)、大量ヒト組織培養で製造される抗体の製造コストは高い。一方、マウスxマウスハイブリドマは大量のタンパクを産生し、これらのセルラインはヒトセルラインより安定なので、これらは有用である。しかしながら、マウス抗体の様な“外来の”抗体をヒトに繰り返して注入すると、有害な過敏性反応を生じることがある。

そのため、最近では、マウス マウスハイブリドマからのモノクローナルの利点を有し、更にヒトモノクローナル抗体の種特異性を有する抗体の産生の可能性が探求されている。

免疫学者が直面するその他の問題は、細胞培養で得られるほとんどのヒトモノクローナル抗体 (即ち、ヒト認識特性を有する抗体) がIgMタイプであるということである。しかしながら、IgGタイプのヒトモノクローナルを得るのが望ましい場合、IgMタイプの主要な産生抗体からIgGまたはその他のタイプの産生抗体にスイッチした少数の細胞を分離するために、細胞選別の様な方法を使用することが必要であった。従って、予め決定されているかまたは所望の抗原特異性を有する一定の抗体を得るために、抗体のクラスをスイッチするためのより容易な方法が必要である。

本発明は、ハイブリドマおよびモノクローナル抗体技術の両者を橋渡しし、キメラヒト/非ヒト抗体または“クラススイッチされた”抗体の産生を高めるための迅速かつ効率的な方法、およびそれから誘導される産物を提供するものである。

情報開示申告 注) この情報開示申告は、37C.F.R. 1.97 (b) の規定に従うものである。また、出願人らは、出願人らの発明が1またはそれ以上の記載された出版物より前になされたことを証明する権利を保有している。

キメラ抗体産生の問題へのアプローチは、種々の著者によって発表されている。

モリソン等 (Morrison, S.L. et al.) のProc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:6851-6855 (1984年11月) は、既知の抗原結合特異性を有するマウス抗体産生骨髄腫セルラインの可変部遺伝子を組換えDNA法を使用してヒト免疫グロブリン不変部遺伝子に結合させることによって製造された、一定の抗原結合特異性を有するマウス-ヒト抗体分子の製造を記載している。骨髄腫セルラインS107由来の重鎖可変部エクソンがヒトIgG1またはIgG2重鎖不変部エクソンに好適に結合され、同じ骨髄腫由来の軽鎖可変部エクソンがヒトカッパ軽鎖エクソンに好適に結合されたキメラ遺伝子が構築された。これらの遺伝子はマウス骨髄腫セルラインにトランスフェクトされ、キメラマウス-ヒト抗ホスホコリン抗体を産生する形質転換細胞が生育された。

モリソン等 (Morrison, S.L. et al.) のヨーロッパ特許公開第173494号 (1986年3月5日公開) は、1つの種由来の可変部とその他の種由来の不変部を有するキメラ“レセプター” (例えば抗体) を開示している。遺伝子を構築するためのcDNAクローニングの利用について記載されているが、cDNAクローニングまたはプライミングの詳細な説明はない。(5、7および8頁参照)。

ブリアンヌ等 (Boulianne, G.L. et al.) のNature, 312:643 (1984年12月13日) も、ヒト不変部にマウス可変部が結合してなる抗体を製造した。彼らは、ハブテンであるトリニトロフェニル (TNP) に特異的なマウス可変部をコードしているDNAセグメントが、ヒトミューおよびカッパ不変部をコードしているセグメントに結合している免疫グロブリン遺伝子を構築した。これらのキメラ遺伝子は機能的TNP結合キメラIgMとして発現された。

ブリアンヌ等 (Boulianne et al.) およびモリソン等 (Morrison et al.) の研究に関する解説については、マンロー (Munro) のNature, 312:597 (1984年12月13日)、ディクソン (Dickson) のGenetic Engineering News, 5, No. 3 (1985年3月)、またはマルクス (Marx) のScience, 229:455 (1985年8月) を参照されたい。

ニューバーガー等 (Neuberger, M.S. et al.) のNature, 314:268 (1986年3月25日) も、ハブテン、4-ヒドロキシ-3-ニトロフェナセチル (NP) に特異的なマウス可変部をコードしているDNAセグメントが、ヒトイプシロン領域をコードしているセグメントに結合しているキメラ重鎖免疫グロブリン遺伝子を構築した。このキメラ遺伝子がJ558iセルラインにトランスフェクトされた時、NPハブテンに結合し、ヒトIgE特性を有する抗体が産生された。

ニューバーガー等 (Neuberger et al.) は更に、Fc部分が活性酵素部分 (ウィリアムスおよびニューバーガー (Williams, G. and Neuberger, M.S. Gene 43:319, 1986) またはc-myc抗原決定基を表わすポリペプチド (Nature, 312:604, 1984) で置き換えられた、ハブテン特異的抗体を分泌するセルラインの製造を示す研究を発

10

20

30

40

50

表している。

ニューバーガー等 (Neuberger, M. et al.) のPCT公開086/01533 (1986年3月13日公開) も、キメラ抗体の製造 (5頁参照) を開示し、この方法の多数の用途の中で、“クラススイッチ”の概念を示唆している (6頁参照)。

タニグチ (Taniguchi, M.) は、ヨーロッパ特許公開第171 496号 (1985年2月19日公開) に、試験動物由来の腫瘍特異性を持った可変部、およびヒト由来の不変部を有するキメラ抗体の製造を開示している。対応する重鎖および軽鎖遺伝子はゲノム形態で作成され、哺乳動物細胞中で発現される。

タケダ等 (Takeda, S. et al.) のNature, 314:452 (1985年4月4日) は、レトロウイルスベクターの使用によって除去されるイントロン配列を有するキメラ免疫グロブリン遺伝子を構築し得る方法を記載している。しかしながら、予想外のスプライス供与部位によって、V領域リーダー配列の欠失を生じた。即ち、このアプローチでは、完全なキメラ抗体分子が得られなかった。

カビリー等 (Cabilly, S. et al.) のProc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3273-3277 (1984年6月) は、抗一癌胎児性抗原 (CEA) 抗体の重鎖および/または軽鎖のE. コリでの合成を導くプラスミドを記載している。重鎖 (Fd') フラグメントの先端を切り取った形態をE. コリ中で発現させるために、他のプラスミドが構築された。機能的CEA-結合活性は、E. コリ抽出物中、重鎖の一部分と軽鎖のイン・ビトロでの再構成によって得られた。

カビリー等 (Cabilly, S., et al.) のヨーロッパ特許公開125023 (1984年11月14日公開) は、キメラ免疫グロブリン遺伝子およびその予定産物、およびその他の修飾形態を記載している。これは、21、28および33頁でcDNAクローニングおよびプライミングを議論している。

ボス (Boss, M. A.) のヨーロッパ特許出願120694 (1984年10月3日公開) は、4-ニトロフェニル特異性を有する非キメラ免疫グロブリン鎖のE. コリの発現を示している。キメラ抗体について広範に記載されているが、詳細な記載はない (9頁参照)。

ウッド等 (Wood, C. R. et al.) のNature, 314:446 (1985年4月) は、酵母中でマウス抗-NP抗体タンパクの合成を導くプラスミドを記載している。重鎖ミュー抗体タンパクは、酵母細胞中でグリコシル化されるらしかった。重鎖および軽鎖の両者が同一細胞中で合成された時、幾らかのタンパクは、酵母細胞から製造される可溶性タンパク中、抗-NP結合活性によって検出される機能的抗体分子に組み立てられた。

アレキサンダー等 (Alexander, A. et al.) のProc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:3260-3264 (1982) は、19-アミド酸リーダー、次いで、V領域の最初の15残基を含有している、異常に短いヒトIgGガンマ重鎖 (OMM ガンマ³HCD 血清タンパク) をコードしているcDNA配列の構造を記載

している。長い内部欠失によって、V領域の残部および全C_H1ドメインが除去される。これは、内部欠失している分子をコードしているcDNAである。

ドルビー等 (Dolby, T. W. et al.) のProc. Natl. Acad. Sci., USA, 77:6027-6031 (1980) は、ミューおよびカッパヒト免疫グロブリンポリペプチドをコードしているcDNA配列およびそれを含有している組換えプラスミドの製造を記載している。組換えDNA分子の1つはC_H2不変部ドメインおよび全3' 非コード配列の一部分のためのコドンを含んでいた。

セノ等 (Seno, M. et al.) のNucleic Acids Research, 11:719-726 (1983) は、ヒトIgE重鎖 (イプシロン鎖) の可変部の一部分および不変部の全てをコードしているcDNA配列およびそれを含有している組換えプラスミドの製造を記載している。

クロカワ等 (Kurokawa, T. et al.)、前掲、11:3077-3085 (1983) は、cDNAを使用する、ヒトIgE重鎖の不変部をコードしている3種類の発現プラスミドの構築を示している。

リウ等 (Liu, F. T. et al.) のProc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:5369-5373 (1984年9月) は、ヒトIgE重鎖のC_H2ドメインの約3分の2およびC_H3およびC_H4ドメインの全てをコードしているcDNA配列およびそれを含有している組換えプラスミドの製造を記載している。

ツジモト等 (Tsujiimoto, Y. et al.) のNucleic Acids Res., 12:8407-8414 (1984年11月) は、クローニングされた不変部遺伝子をcDNA合成のためのプライマーとして利用することによる、Igラムダー産生ヒドバーキットリンバ腫セルラインからのヒトVラムダcDNA配列の製造を記載している。

マーフィー (Murphy, J.) のPCT公開083/03971 (1983年11月24日公開) は、毒素および細胞特異的リガンド (抗体であるかもしれないと示唆されている) を含有しているフラグメントからなるハイブリッドタンパクを開示している。

タン等 (Tan, et al.) のJ. Immunol. 135:8564 (1985年11月) は、マウス骨髄腫細胞にトランスフェクトした後、キメラヒト-マウス免疫グロブリンゲノム遺伝子の発現を得た。

ジョーンズ等 (Jones, P. T., et al.) のNature 321:552 (1986年5月) は、ヒト抗体中の対応するドメインを置き換えるためにマウスモノクローナル抗体からの可変部のCDRドメインが使用されたゲノム構築物を構築し、発現させた。

サン等 (Sun, L. K. et al.) のHybridoma 5 suppl. 1 S17 (1986) は、腫瘍特異性を有する可能性のあるキメラヒト/マウス抗体を記載している。キメラ重鎖および軽鎖遺伝子はゲノム構築物であり、哺乳動物細胞で発現される。

サハガン等 (Sahagan et al.) のJ. Immun. 137:1066-

1074 (1986年8月) は、ヒト腫瘍関連抗原に対する特異性を有するキメラ抗体、ゲノム配列から構築された遺伝子を記載している。

この分野の最近の評論については、モリソン (Morrison, S.L.) の Science 229:1202-1207 (1985年9月20日) およびオイ等 (Oi, V.T. et al.) の BioTechniques 4:214 (1986) も参照されたい。

オイ等 (Oi, et al.) の論文は、酵母および/または細菌中のcDNA構築物からのキメラ抗体の製造が必ずしも有利ではないことを論議しているので、関連がある。

Biotechnology 4 (1986) 835頁の解説も参照されたい。

発明の要約

本発明は、軽鎖および重鎖の遺伝子クローニングおよび発現による、所望の可変部特異性および不変部特性を有する遺伝子操作された抗体を製造するための新規なアプローチを提供する。クローニングされた免疫グロブリン遺伝子産物は、遺伝子操作された生物中での発現によって製造することができる。

化学的遺伝子合成、組換えDNAクローニング、および種々の生物中での特異的免疫グロブリン鎖の製造の適用は、ヒトモノクローナル抗体の効率的な大量生産のための有効な解決を提供する。本発明はさらに、一定のクラスのある種の結合特異性を有する免疫グロブリンを容易に製造するための、クラススイッチ抗体分子の問題に対する解決を提供する。

本発明は、ヒトの不変部、およびヒトまたは非ヒトの可変部を含有する免疫グロブリン鎖をコードしているcDNA配列を提供する。免疫グロブリン鎖は重鎖であっても軽鎖であってもよい。

本発明は、ヒトまたは非ヒト由来のcDNA可変領域およびヒト由来のゲノム不変領域を含有する、免疫グロブリン鎖をコードしている遺伝子配列を提供する。

本発明はまた、原核生物または真核生物由来の分泌シグナル配列を有する、免疫グロブリン鎖をコードしている遺伝子配列を提供する。

本発明はまた、所望の原核生物または真核生物宿主中で発現し得る組換えDNA分子、とりわけプラスミドベクターの様なビヒクルに存在する、上記の様な配列を提供する。

本発明はまた、複数の重鎖および軽鎖の発現のためのジストロンメッセージをコードしている1個の細菌性プロモーターを有する遺伝子配列を提供する。

本発明はまた、所望の特異性を有する可変部をコードしているハイブリドーマmRNAのハイブリダイゼーションおよびcDNA合成をプライミングするためのプローブとして有用なコンセンサスな配列および特異的オリゴヌクレオチド配列を提供する。

本発明は、培養によってキメラ抗体を産生し得る宿主およびこれらの宿主の使用法を提供する。

本発明はまた、ヒト不変部および非ヒト可変部を有するキメラ免疫グロブリン各鎖、全てが集合した分子、および免疫グロブリンフラグメント (例えばFab) を提供する。ここで、両者の可変部は同じ結合特異性を有している。

その他の免疫グロブリン鎖および/または分子の内、本発明は:

(a) (i) 非ヒト可変部およびヒト不変部を含有する2本の同一キメラ重鎖および

(ii) 2本の同一全 (即ち、非キメラ性) ヒト軽鎖を含有する完全な機能的免疫グロブリン分子、

(b) (i) 非ヒト可変部およびヒト不変部を含有する2本の同一キメラ重鎖および

(ii) 2本の同一全 (即ち、非キメラ性) 非ヒト軽鎖

を含有する完全な機能的免疫グロブリン分子、

(c) (i) 非ヒト可変部およびヒト不変部を含有する2本の同一キメラ重鎖および

(ii) 一方のみが重鎖の可変部と同じ特異性を有する2本の異なる軽鎖

を含有する1価の抗体、即ち完全な機能的免疫グロブリン分子 (得られた抗体分子は、その一方の末端にのみ結合し、2価結合し得ない)、

(d) (i) 第1のキメラ重鎖が非ヒト可変部およびヒト不変部を含有し、第2のキメラ重鎖が別の非ヒト可変部およびヒト不変部を含有する2本の異なるキメラ重鎖および

(ii) 第1のキメラ軽鎖が、第1の重鎖可変部と同じ特異性を有する非ヒト可変部、およびヒト不変部を含有し、第2のキメラ軽鎖が、第2の重鎖可変部と同じ特異性を有する非ヒト可変部、およびヒト不変部を含有している2本の異なるキメラ軽鎖

を含有する、2種類の特異性を有する抗体、即ち、完全な機能的免疫グロブリン分子 (得られた抗体分子は、2種類の抗原に結合する)、を提供する。

本発明はまた、原核生物または真核生物宿主によって分泌される機能的に活性なキメラ免疫グロブリンフラグメントまたは完全に折り畳まれているかまたは再集合したキメラ免疫グロブリン鎖の製造法を提供する。

本発明は、キメラ鎖または非キメラ鎖の上記組合せをコードしている遺伝子配列、とりわけcDNA配列をも提供する。

本発明はまた、免疫グロブリン鎖とは異なるポリペプチド (例えば酵素) をコードしている配列に操作可能に結合している抗体分子重鎖および/または軽鎖の可変部をコードしている遺伝子配列、とりわけcDNA配列を提供するものである。これらの配列を本発明の方法によって組み立て、発現させて、混合された機能の分子を製造することができる。

11

cDNA配列の使用は、cDNA配列が、RNAスプライス系のない細菌またはその他の宿主中で発現され得るという点で、(イントロンを含む)ゲノム配列よりも好都合である。

とりわけ好ましい特異抗体は、癌-関連抗原に対する特異性を有する抗体である。

図面の簡単な説明

第1図は、免疫グロブリンミューおよびガンマ重鎖遺伝子のDNA再配列および発現を示す。これは、ヒト重鎖遺伝子コンプレックスの図式的表示であるが、一定比で描かれていない。重鎖可変V領域は、V_H、DおよびJ_H遺伝子セグメントの連結によって生成される。これによって、活性なミュー遺伝子が生成される。“クラススイッチ”と呼ばれる異なった種類のDNAの再配列によって、連結されたV_H、DおよびJ_H領域がミュー不変C領域からその他の重鎖C領域(この図ではガンマへの変更が図示されている)へ再配置される。この図式は、J領域が、発現された重鎖遺伝子全ての共通の特徴であることを強調している。J領域は、発現された軽鎖遺伝子の共通の特徴でもある。

第2図は、ヒトおよびマウスJ領域の既知のヌクレオチド配列を示す。J領域についてのコンセンサス配列は、実際の配列の下に示されている。マウスカッパJ領域コンセンサス配列の下にオリゴヌクレオチド配列は、本発明で使用したユニバーサル免疫グロブリン遺伝子(Universal Immunoglobulin Gene)(UIG)オリゴヌクレオチドである。

第3図は、免疫グロブリンメッセンジャーRNAの可変部に相補的なcDNAの合成のためのUIGオリゴヌクレオチドプライマーの使用、またはcDNA合成のためのプライマーとしてのオリゴ-dTの使用、次いでイン・ビトロ突然変異誘発を示す図である。

第4図は、その内の1個(pGMH-6)がクローニングベクター(B)として使用される3個の単離されたクローン(A,b)を含んでいるヒトIgG1遺伝子の合成および分析を示す。BamH IとPvu II間にpBR322配列の1.5kb欠失が印されている。一定比で描かれていない。

第5図は、Kpn I部位でのcDNAクローニングに有用な、修飾されたpBR322であるクローニングベクター-pQ23を示す。このベクターも有用な制限酵素部位Bgl IIおよびSal Iを含有している。一定比で描かれていない。

第6図のAは、ヒト軽鎖カッパ遺伝子の合成および分析を示す。この図は更にBにおいて(一定比で描かれていない)ヒトC_κ領域クローニングベクター-pING2001の構築を示す。

第7図は、免疫グロブリンV領域合成のためにデザインされたプライマーを示す。(A)は、重鎖J-C領域およびプライマーを示す。各マウスJ重鎖領域のDNA形は、この配列からデザインされたプライマーのすぐ上に直接指示されている。マウスJ領域は左から右へ5'から3'であるが、プライマーは左から右へ3'から5'である。プライマーの名称は括弧内に入れられ、ヌクレオチドの数(N)および各J_H領域との不対合の数は右に挙げられている。BstE II部位を導入するプライマーには下線を記す。(B)は、軽鎖J領域およびプライマーを示す。軽鎖であること以外は(A)と同じである。Bg III部位を導入するためにデザインされたプライマーには下線を付し、pING2016Eに存在するBcl I部位も同様である。(C)は、マウス可変部コンセンサスUIGプライマーを示す。実際のプライマー配列は、このコンセンサス配列の下に示されている。ヒトC_κHind IIIベクター-pGML60は下に示されている。(D)は、マウスガンマ2a J/C連結プライマーを示す。

12

第8図は、オリゴヌクレオチドを鋳型としたcDNA合成による、重鎖V領域モジュール遺伝子の合成を示す。一定比で描かれていない。

第9図は、ハイブリッドマウス-ヒト免疫グロブリン遺伝子の構築を示す。パネルAは、重鎖遺伝子の構築を示す。点描された領域はC領域モジュールを示し、平行線または黒の領域はV領域モジュールを示す。一定比で描かれていない。

第10図は、哺乳動物細胞のためのcDNAクローニング発現シャトルベクターの構築を示す。ベクター-pING2003およびpING2003Eは、pL1、pUC12、pSV2-neoおよびM8-アルファRX12由来である。点描された領域はマウス重鎖エンハンサーDNAを示し、平行線の領域は、pL1由来のSV-40DNAを示し、交差平行線の領域はpSV2-neo由来のSV-40を示す。ベクター-pING2003およびpING2003Eでは、濃い線はpSV2-neo由来のpBR322DNAを示し、薄い線はpUC12DNAを示す。矢印はSV-40初期領域プロモーターの位置および方向を示し、完全なSV-40イントロン配列を示す。一定比で描かれていない。

第11図は、重鎖発現プラスミドpING2006Eの構築を示す。矢印は、SV-40プロモーターの位置および転写の方向を示す。平行線および黒の範囲はマウスV領域モジュールを示し、点描された範囲はヒトC領域モジュールを示す。一定比で描かれていない。

第12図は、発現プラスミドpING2006EおよびpING2012Eにおけるキメラ抗肝炎重鎖遺伝子の構築を示す。パネルAはマウス-ヒトキメラ抗肝炎重鎖遺伝子の構築を示す。ヒトIgG1 mRNAおよびcDNAの構築はA.a.に示される。ヒト重鎖不変部cDNAクローン-pGMH-6およびマウス重鎖可変部cDNAクローン-pBS13-1およびpJ3-11は、pING2006Eで使用されるハイブリッド遺伝子を作成するために使用された。平行線の遺伝子ブロックはマウス可変部配列を示し、白の遺伝子ブロックはヒトIgG1不変部配列を示す。パネルBは、pING2006EおよびpING2012Eにおける抗肝炎B重鎖可変部のヌクレオチド配列を示す。pING2012Eは、最初に、pING1202のSal I部位にBgl II部位を挿入してpING1202EBgl IIを作成することによって構

築された(第16図参照)。このプラスミド由来のキメラ重鎖遺伝子を発現ベクターpING2003Eに挿入し、pING2012Eを得た。pING2012Eは、イニシエーターATGのすぐ上流の領域でpING2006Eと異なる。下線を引いたヌクレオチドはcDNAクローンpGMH-6由来のヒトJ領域配列を意味する。星印のアミノ酸117は、キメラ遺伝子J領域に導入された、マウスからヒト配列へのこの部位での1個の変更(AlaからSer)を示す。配列決定は、プラスミド(白丸)およびM13(黒丸)鋳型について、サンガー法によった。

第13図のパネルAは、pING2001由来の軽鎖クローン(pMACK-3、pING2013E、pING2007E、pING2010E-gptおよびpING2014E-gpt)におけるJ-C連結領域ヌクレオチド配列を示す。pK2-3起源のJ領域配列はヒトJK4で示す。ゲノム配列決定によって予想されなかったGヌクレオチドには星印を付す。この配列を修飾するために使用されたオリゴヌクレオチドプライマー(K2-4BCL1)を、ヒトJK4配列の下に示す。パネルBは、pING2016E-gptを作成するために使用された部位導入突然変異誘発の方法を図示する。一定比で描かれていない。

第14図は、2種の形質転換体中のトランスフェクトされた配列の遺伝子コピー数である。2AE9、2BH10由来のnDNAを、記載の酵素で消化した。DNAの濃度は、レーンを横切り、その上に記載した量で下方向に滴定した。プロンプはヒトCガンマ1配列(pmvHc24 Apa I-BamH I)を含有する。対照はApa Iで消化した生殖系列またはGM2146nDNAである。3' Apa I部位は、ポリ(A)付加(3)の2bp先である。

第15図は、L6V_HcDNAクローンpH3-6aのV領域のヌクレオチド配列を示す。この配列は、遺伝子フラグメントのM13サブクローン(下記)を使用し、ジデオキシターミネーション法によって決定した。白丸は、ペプチド配列によって確認されたアミノ酸残基を示す。CDR3領域においてD_{sp,2}にホモロガスな配列に下線を付す。

第16図は、L6V_KcDNAクローンpL3-12aのV領域のヌクレオチド配列を示す。部位導入突然変異のために使用したオリゴヌクレオチドプライマーをJ_K5セグメントの下に示す。白丸は、ペプチド配列によって確認されたアミノ酸残基を示す。

第17図は、キメラL6-V_HプラスヒトCガンマ1発現プラスミドの構築を示す。パネル(a)は、BAL-31欠失クローンM13mp19-C1-デルタ4(C1-デルタ4)およびM13mp19-C1-デルタ21(C1-デルタ21)の配列を示す。cDNAクローン、pH3-6aの5'末端を矢印で示す。M13配列に下線を付す。この試験のために使用したオリゴヌクレオチドプライマーは、成熟N末端付近のFR1を鋳型とするH3-6a(5'-GACTGCACCACTGG-3')である。パネル(b)は、それぞれ、31-マーのオリゴヌクレオチドMJH2-Apa I 20ngにアニーリングしているク

ローン、C1-デルタ4およびC1-デルタ21 1μgの部位導入突然変異誘発のための方法を示す。DNAポリメラーゼのクレノウフラグメントと相補的な鎖の合成は、室温にて30分間、次いで15℃で72時間である。トランスフェクトされたファージブラークをニトロセルロースに吸着させ、NaOHで固定し、³²Pで標識されたMJH2-Apa Iオリゴヌクレオチドに対し、4×TBS(0.6M NaCl、0.04M トリス-HCl(pH7.4)、0.004M EDTA)プラス10%デキストランサルフェート中、65℃で18時間ハイブリダイズさせた。フィルターの最終洗浄を65℃、4×SSPE、0.1%SDSで15分間行った。(マニアティス等(Maniatis, T., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982)。陽性のブラークを、コダックXARフィルムに一夜接触させることによって検出し、増殖およびRFDNAの制限酵素分析について直接、選択した。マウスC_H1に対するMJH2-Apa Iオリゴヌクレオチドのミスマッチが示されており、オリゴヌクレオチドの下に示されたコード化の変化として現される。パネル(c)は、pING2111およびpING2112を製造するための、キメラ発現プラスミドpING2012の固有のV_Hに代って突然変異誘発されたL6-V_Hモジュール各々を置換する方法を示す。

第18図は、キメラL6発現プラスミドpING2119の構築を示す。pING2100由来のSal I-BamH Iフラグメントは、pING2012E由来のSal I-BamH I Aフラグメントと同一である。

第19図は、軽鎖および重鎖プラス軽鎖発現プラスミドの構築におけるV_K遺伝子の修飾およびその用途を示す。

(a) L6のV_Kのオリゴd[GC]セグメント5'の欠失。このオリゴヌクレオチドは22-マーであり、Sal I部位を含んでいる。3個のミスマッチが示される。突然変異誘発後のV_K遺伝子を、ヒトC_Kモジュールに、Sal I-Hind IIIフラグメントとして連結させる。この様にして製造される発現プラスミドはpING2119である。

(b) pING2114は、重鎖プラス軽鎖発現プラスミドである。この発現プラスミドpING2114は、pING2111由来のL6重鎖キメラ遺伝子およびpING2119(太線)由来のキメラ軽鎖を含有している。

第20図は、L6キメラ抗体発現プラスミドの構築において行なわれた配列変更の概略を示す。5'非翻訳領域における下線の残基は、クローニングされたマウスカッパおよび重鎖遺伝子から誘導される。V/C境界において丸で囲まれた残基は、この領域における制限酵素部位を設けるための突然変異誘発操作に由来する。L6重鎖キメラにおいてその上に小さな丸を付された残基も、突然変異誘発に由来する。これらはサイレントな変化である。

第21図は、2H7 V_H配列を示す。V_H遺伝子は、J_H1配列およびDSP₂配列エレメントを含有する。アミノ酸残基の上の小さな丸は、ペプチド配列にマッチしたアミノ酸残基である。

第22図は、2H7V_L配列を示す。V_K遺伝子は、J_K5

15

配列を含有する。22-マーのオリゴヌクレオチドは、ATGイニシエーターコードンの5'にSal I部位を位置させるために使用された。アミノ酸残基の上の小さな丸は、ペプチド配列にマッチしたアミノ酸残基を示す。

第23図は、2H7特異性を有するキメラ免疫グロブリン遺伝子発現プラスミドを示す。1遺伝子プラスミドはpING2101 (V_H, neo)、pING2106 (V_κ, neo) およびpING2107 (V_κ, gpt)である。その他は、2遺伝子プラスミドである。これらの構築は、pING2101およびpING2107の大きい方のNde Iフラグメントを、Nde Iで部分消化した直線化pING2106にライゲートすることを含む。pING2101およびpING2106からpHL2-11およびpHL2-26が得られ、pING2107およびpING2106からpLL2-25が得られた。

第24図は、キメラプラスミドの構築においてV_HおよびV_κに導入されたヌクレオチド変更の概略を示す。5'末端における同系のV_HおよびV_κヌクレオチド残基に下線を付す。J-C結合における丸を付された残基は、ヒトCモジュール由来である。

第25図は、成熟L6キメラ軽鎖配列を酵母インペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合させるために使用した方法を示す。不連続の二重線は、酵母インペルターゼシグナル配列DNAを示す。連続した二重線は、酵母PGK DNAを示し；→はPGKプロモーターを示し；

+

はPGKターミネーターを示し；RF=複製型である。pING1225は、ヒトC_κDNAをPGKプロモーターに融合させることによって誘導された。pING1149は、酵母インペルターゼシグナル配列を酵母PGKプロモーターに融合させることによって誘導された。(A)は、イン・ビトロ突然変異誘発によって、シグナル配列プロセッシング部位にAat II部位を導入するための方法を示す。(B)は、1本鎖突然変異誘発プライマーのDNA配列および対応する非突然変異誘発DNA配列を示す。(C)は、インペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合された成熟軽鎖配列を含有しているプラスミドを構築するために使用された方法を示す。

第26図は、成熟L6キメラ重鎖配列を、酵母インペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合させるために使用した方法を示す。pING1288は、2H7マウスモノクローナル抗体由来の可変部を有するキメラ重鎖遺伝子を含有する(実施例IV参照)。全ての記号は、第25図についての記号と同意義である。(A)は、イン・ビトロ突然変異誘発によって、シグナル配列プロセッシング部位にSst Iを導入するための方法を示す。(B)は、1本鎖突然変異誘発性プライマーのDNA配列および対応する非突然変異誘発DNA配列を示す。(C)は、インペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合された成熟重鎖配列を含有するプラスミドを構築

16

するために使用された方法を示す。

第27図は、L6キメラ軽鎖遺伝子から非酵母3'非翻訳DNA配列を除去し、全ての配列がDNA配列分析によって既知であるか、または機能的であることが判明しているインペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合された軽鎖遺伝子を含有するプラスミドを構築するために使用された方法を示す。pBR322NAIは、Nde I~Aua IのDNAの欠失によって、pBR322から誘導される。記号は第25図のための記号と同意義である。

第28図は、L6キメラ重鎖遺伝子から非酵母3'非翻訳DNA配列を除去し、全ての配列がDNA配列分析によって既知であるか、または機能的であることが判明しているインペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合された重鎖遺伝子を含有するプラスミドを構築するために使用された方法を示す。記号は第25図のための記号と同意義である。

第29図は、インペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合されたL6キメラ軽鎖遺伝子を、PGK転写終止-ポリアデニル化シグナル、酵母複製配列および形質転換体の選択のための遺伝子を含有する酵母-E. コリシャトルベクターにクローニングするために使用された方法を示す。記号は、第25図のための記号と同意義である。

第30図は、インペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合されたL6キメラ重鎖遺伝子を、PGK転写終止-ポリアデニル化シグナル、酵母複製配列および形質転換体の選択のための遺伝子を含有する酵母-E. コリシャトルベクターにクローニングするために使用された方法を示す。記号は、第25図のための記号と同意義である。

第31図は、ヒトIgG1の構造の図式表示を示す。

第32(A)図は、ヒトガンマ1のヒンジ領域に終止コドンおよびBcl I部位を導入するために使用した方法を示す。(B)は、ガンマ1ヒンジ領域のイン・ビトロ突然変異誘発のために使用した1本鎖プライマーのDNA配列および対応する非突然変異誘発配列を示す。垂直の矢印は、鎖内部のジスルフィド結合を示す。記号は、第25図のための記号と同意義である。

第33図は、ヒンジ領域(Fd鎖)における終止コドンを含有しているL6キメラ重鎖遺伝子を、酵母インペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合するために使用した方法を示す。記号は、第25図のための記号と同意義である。

第34図は、L6キメラFd鎖から非酵母3'非翻訳配列を除去し、全ての配列がDNA配列分析によって既知であるかまたは機能的であることが判明しているインペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合されたFd鎖を含有しているプラスミドを構築するために使用した方法を示す。記号は、第25図のための記号と同意義である。

50

第35図は、インペルターゼシグナル配列および短縮PGKプロモーターに融合されたL6キメラFd鎖遺伝子を、PGK転写終止-ポリアデニル化シグナル、酵母複製配列および突然変異体の選択のための遺伝子を含有している酵母-E.コリシャトルベクターにクローニングするために使用した方法を示す。記号は、第25図のための記号と同意義である。

第36(A)図は、エルウィニア・カラトボラ (*Erwinia caratovora*) pelB遺伝子のN-末端周辺のヌクレオチド配列を示す(レイ等 (Lei, S.P., et al., J. Bacteriol. (1987, 印刷中))。クローニングに使用したNde IおよびHae III部位を示す。矢印は、ペクチン酸リアーゼのためのリーダーペプチダーゼ切断部位を示す。(B)は、pelBリーダーカートリッジの構築のためのクローニング法を示す。pSS1004は、pUC8のSma I部位にクローニングされた1.9kb-Dra Iフラグメントを含有する。記号は、第39図のための記号と同意義である。

第37図は、軽鎖発現プラスミドpRR177-8、pRR180、pRR190およびpRR191の構築を示す。このテキストに記載したプラスミド以外に、M13mp18およびpIT181を使用した。pIT181は、pIT2におけるaraB遺伝子のATG開始コードのすぐ後に融合された成熟軽鎖遺伝子を含有する(第40図参照)。

第38図は、Fd発現プラスミドpRR178-5、pRR186およびpRR196の構築を示す。

第39図は、軽鎖およびpFK100、pFK101、pFK102、pFK103およびpFK104におけるFd遺伝子カセットの制限地図を示す。これらのプラスミドは、第37図および38図に概略を示したプラスミドを使用し、テキストの記載の様に構築した。矢印は、lacプロモーターからの転写の方向を示す。E.カラトボラおよび真核生物の非コード配列を白い部分で示す。pelBリーダー配列は、交差平行線であり、黒い部分は、抗体遺伝子Fdおよび軽鎖(κ)を示す。

第40(A)図は、アラビノース誘導性Fab発現のためのベクターの構築を示す。プラスミドpIT2(メイソンおよびレイ (Mason and Ray, Nucl. Acids Res. 14:5693 (1986))は、pBR322の誘導体におけるpING1由来のaraC遺伝子、araBプロモーターおよびaraB遺伝子の一部分をコードしている6431bpプラスミドである(ジョンストン等 (Johnston, S., et al., Gene 34:134 (1985))。Nco I部位は、araB遺伝子のATG開始コード中に設けられた。

(B)は、pFK102へのlaci遺伝子の導入を示す。

好まじい態様の説明
序論

一般に、抗体は2つのL鎖および2つのH鎖分子から構成される。H鎖およびL鎖は構造的および機能的な相同関係にあるドメインに分かれている。L鎖およびH鎖の可変領域(それぞれV_LおよびV_H)は、認識能および特異性を決定する。L鎖およびH鎖の定常領域(それぞれ

C_LおよびC_H)は、抗体鎖の会合、分泌、胎盤經由の挙動、補体結合性などの重要な生物学的性質を付与する。

複雑な一連の事象によって、B細胞において免疫グロブリン遺伝子の発現が導かれる。抗原特異性および結合性を付与するV領域遺伝子配列は、V_H、DおよびJ_H、またはV_LおよびJ_Lと呼ばれる異なる生殖系列遺伝子セグメントに局在している。これらの遺伝子セグメントは、DNAの再配列によって結合し、それぞれH鎖およびL鎖で発現される完全なV領域を形成する(第1図)。そして、この再配列し、結合した(V_L-J_LおよびV_H-D-J_H) Vセグメントは、完全な可変領域、すなわちそれぞれL鎖およびH鎖の抗原結合性ドメインをコードしている。

定義

本明細書および請求の範囲では、特定の用語および成句を使用している。以下に定義を与えることにより、明瞭化および統一性を図る。

1. 発現ベクター: ベクターに挿入することが可能な、遺伝子配列由来のmRNAの合成に必須の調節シグナルを含有しているプラスミドDNA。

2. モジュールベクター (module vector): 定常または可変領域遺伝子モジュールを含有するプラスミドDNA。

3. 発現プラスミド: キメラ性免疫グロブリンなどの挿入遺伝子を包含する発現ベクター。

4. 遺伝子クローニング: 遺伝子の合成、DNAベクターへの挿入、およびハイブリダイゼーションなどによる同定。

5. トランスフェクション: 哺乳類細胞へのDNAの移入。

6. プロモーター領域: 操作的に連結されたシストロンまたはオペロンを発現するために必要とされる調節配列を細胞に付与するヌクレオチド配列。

7. 分泌シグナル: 宿主の外にキメラ性免疫グロブリンの鎖を分泌するのに役立つ、該キメラ性免疫グロブリン鎖のN-末端に存在するポリペプチド。「先導ペプチド」または「リーダー」とも呼ばれる。

遺伝子操作および産物

本発明は、所望の特異性を有するヒト抗体をクローニングおよび生産するための新規な方法を提供するのである。一般には、この方法は、以下の5つの工程からなる:

(1) 特定の抗原に対するモノクローナル抗体を産生するB細胞ハイブリドーマ系統から、メッセンジャーRNA (mRNA) を単離し、それをクローニングしてcDNAを調製し、

(2) 特定のヒトまたは非ヒトハイブリドーマ細胞系統由来のL鎖およびH鎖mRNA内の可変領域遺伝子セグメントをクローニングするためのプライマーおよび/またはプローブとして有用である全免疫グロブリン遺伝子

19

(UIG) オリゴヌクレオチドを調製し、それからcDNAを調製し、

(3) cDNAの調製およびクローニング、またはゲノム遺伝子の調製およびクローニングによって定常領域遺伝子セグメントのモジュールを調製し、

(4) 上記(2)のクローニングした特異的免疫グロブリン可変領域遺伝子セグメントを、クローニングしたヒト定常領域遺伝子セグメントのモジュールと連結することによって、完全なH鎖またはL鎖コード化領域を構築し、

(5) 白血球および赤血球宿主などの選択した宿主においてL鎖およびH鎖を、別々に発酵させた後にインビトロで抗体分子を組み合わせるか、またはそれら両方の鎖を同じ細胞で産生させ、発現、生産する。

本発明は、cDNAのクローニング用にmRNAを単離するため、規定された特異性を有するモノクローナル抗体を産生するクローニングしたハイブリドーマ細胞系統を使用する。多くのリンパ球細胞系統は、単離時にmRNAを分解する高度な活性ヌクレアーゼを含有しているため、本発明では、活性ヌクレアーゼを含有する細胞および組織から無傷のmRNAを単離するために特別に開発されたmRNA調製法を利用する。細胞または組織の破壊物から全RNA調製物が得られるこのような方法は、ヌクレアーゼ作用を減退させるエタノール-過塩素酸塩ドライアイス混合物法である[リザード(Lizardi, P.M.)らのAnal. biochem. 98:116 (1979)]。この方法により、翻訳され得る無傷のmRNAが得られる。

本発明に使用される他の方法としては、細胞を、尿素を加えた塩化リチウム[アフレイら(Auffray, C.およびRougeon, F.)のEur. J. Biochem., 107:303 (1980)]、またはグアニジン・チオシアネート[チルウィン(Chirgwin, J.M.)らのBiochemistry, 18:5294 (1979)]で抽出して全RNAを調製することがある。

発現される免疫グロブリンL鎖およびH鎖遺伝子、ならびにメッセンジャーRNAのすべてに統一的な1つの特徴は、いわゆるJ領域(すなわち、結合領域、第1図参照)である。H鎖およびL鎖のJ領域は別々の配列を有しているが、H鎖J領域または κ (カッパ) L鎖J領域内には高い程度の配列相同性が存在する(80%以上)。本発明は、免疫グロブリンのL鎖またはH鎖mRNAまたは遺伝子をクローニングするためのプライマーまたはプローブとして使用できるオリゴヌクレオチド(本明細書ではUIGと命名する)を設計する上で有用なL鎖およびH鎖J領域の一定配列(コンセンサス配列)を提供するものである(第2図または第7図)。設計する個々のUIGの特性に応じてそれを、1つの特異的J領域、たとえばマウスJ_H3配列のみを検出するUIG-MJH3を含有する遺伝子または全免疫グロブリンmRNAにハイブリダイグすることができる(第7図)。

具体的なUIGプローブのもう1つの有用性として、マ

20

ウスJ_Hを含有する配列すべてを検出するUIG-MJH3などの特定の定常領域のL鎖またはH鎖mRNAとハイブリダイゼーションさせることが挙げられる(第7図)。UIGの設計物はさらに、免疫グロブリン遺伝子のcDNA複製物に制限酵素部位を挿入するための配列を含有させることができる(第7図参照)。たとえば、本発明は、キメラ遺伝子の合成に利用すれば、所望の抗原特異性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞由来の免疫グロブリンmRNAにおけるV領域をクローニングするためのUIGプローブを作成することができる。

ハイブリドーマ細胞のL鎖およびH鎖mRNAから完全なV+C領域のcDNAクローンを作成するには、多段階操作を行う。第1段階では、本発明は、UIGプローブを、H鎖およびL鎖mRNAの完全なV領域および先導コード化配列を逆転写酵素で複製するための「プライマー」として使用する(第3図)。次いで、このプライマー延長化cDNAの相補性鎖を合成し、得られた2本鎖cDNAを適当なcDNAクローニングベクター、たとえばpBR322[ガブラーら(GublerおよびHoffman), Gene, 25:263 (1983)]、またはpQ23[第5図、マニアチス(Maniatis, T.)らのモレキュラー・クローニング(Molecular Cloning): A Laboratory Manual, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・パブリケーションズ, ニューヨーク, 224頁(1982)]にクローンする。UIGオリゴヌクレオチドプローブとの特異的なハイブリダイゼーションについて、クローンをスクリーニングする。このスクリーニング操作によって同定される陽性H鎖およびL鎖クローンをマッピングして配列決定し、V領域および先導コード化配列を含有するクローンを選択する。

別の方法では、オリゴdTをプライマーとして使用してcDNAクローンを作成し、次いで標準的なハイブリダイゼーション法によってL鎖およびH鎖クローンを選択する。

第2段階では、C領域遺伝子セグメントのクローニングを利用し、H鎖およびL鎖モジュールベクターを作成する。1つの方法では、ヒトのH鎖およびL鎖免疫グロブリンmRNAのcDNAクローンを調製する。次いで、これらのcDNAクローンを、部位特異的突然変異によってC領域モジュールベクターに変換し、定常領域の境界近くの所望の位置に制限部位を配置させる。別の方法では、C領域モジュールベクターの供給源としてゲノムC領域クローンを利用する。

cDNAのクローニングにおける第3段階は、連結したVおよびC領域を有する配列をコードしている完全なL鎖およびH鎖を作成する。上記のようにして生成させたクローン化V領域セグメントを切除し、L鎖またはH鎖C領域モジュールベクターに連結する。たとえば、完全なヒト κ L鎖C領域および完全なヒト γ 1(ガンマ1) C領域をクローンすることができる。さらに、ヒト γ 1領域を修飾して終止コドンを導入することができ、それに

20

30

40

50

21

より、Fab成分のH鎖部分をコードしている遺伝子配列が得られる。

次いで、機能的に連結したVおよびC領域を有するコード化配列を適当な発現系に移入し、原核生物または真核生物などの適当な宿主で発現させる。「機能的に連結」とは、トリプレットの読取フレームを変化または妨害することなく、連続的に翻訳され得る遺伝子配列を誘導するためのコード化配列のイン・フレーム連結を意味する。

本発明においてcDNA遺伝子配列を使用する1つの具体的な利点は、それらがHまたはLの免疫グロブリン鎖を連続的にコードしているということである。「連続的に」とは、配列がイントロンを含有しないこと（すなわち、ゲノム配列ではないが、逆転写酵素によってmRNAから誘導されることより、むしろ、隣接のエクソンの配列であること）を意味する。本発明によって提供されるcDNA配列のこの特性により、細菌などの原核生物内、すなわち酵母などの真核生物よりも下等な生物宿主内において発現が可能となる。

このcDNAクローニング法のもう1つの利点は、V領域遺伝子モジュールが容易かつ簡単に得られることである。

本明細書中で使用している「非-ヒト」なる用語は、免疫応答を惹起してウイルスの形質転換などにより生成される対応するハイブリドーマまたはB細胞クローンになる使用され得るB細胞を導き得る、ヒト以外のあらゆる動物が包含されることを意味する。このような動物としては、通常、マウスまたはラットなどのげっ歯類が挙げられる。今日では、調製の容易性または広範な入手可能性の理由から、マウスが好ましい非-ヒト動物である。したがって、H鎖およびL鎖可変領域の好ましい供給源として、マウス-マウスハイブリドーマを利用する。

好ましいことに、本発明は全Vおよび/またはC領域cDNA配列を提供するものである。このことは、その配列が、主要な構造部分を欠くことなく、実質的に操作可能なVおよび/またはC領域をコードしていることを意味する。

「定常」および「可変」なる用語は、天然の非キメラ抗体における可変および定常領域により保持されている性質および特徴をコードしている、H鎖またはL鎖いずれかの免疫グロブリン鎖のそれらの領域を表すため、機能的に使用される用語である。既述のように、機能的に操作可能な領域が存在し、利用可能である限り、可変または定常領域に係る完全なコード化領域が存在する必要性は必ずしもない。

mRNAを調製するための供給源ハイブリドーマは広範囲で入手可能である。たとえば、ATCCセルラインとハイブリドーマ(ATCC CELL LINES AND HYBRIDOMAS)のカラログ[1984年12月、アメリカン・タイプ・カルチャー・コ

22

レクション、12301パークローン・ドライブ、ロックヒル、メリーランド、アメリカ合衆国20852、5-9

頁]、およびECACCのカatalog[2版;PHLS CAMR、ポートン・ダウズ、サリスブリー、ウィルズ;SP40JG、英国、30-35頁および40-46頁]を参照のこと。非常に多種の抗原に反応するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを本明細書中で一覧にするが、これらは上記コレクションから入手可能であり、本発明で使うことができる。特に興味深いものは、たとえばDengueコンプレックス特異的(ATCC HB114)、Dengueタイプ1ウイルス(ATCC HB47)、Dengueタイプ2ウイルス(ATCC HB46)、Dengueタイプ3ウイルス(ATCC HB49)、Dengueタイプ4ウイルス(ATCC HB48)、エプスタイン-バー(Epstein-Barr) レセプター(ATCC HB135)、フラビウイルス(Flavivirus)群(ATCC HB112)、B型肝炎表面抗原(ATCC CRL 8017および8018)、単純ヘルペスI型(ATCC HB8068)、単純ヘルペスII型(ATCC HB8067)、インフルエンザウイルス(ATCC CL189)、インフルエンザA型マトリックスプロテイン(ATCC HB64)、インフルエンザA型ウイルス・ヌクレオプロテイン(ATCC HB65)、インフルエンザAバンコク/1/79HA(ATCC HB66)、インフルエンザAWSN NP(ATCC HB67)、SV40巨大T抗原(ATCC TIB115)、SV40巨大T抗原、C-末端(ATCC TIB117)、およびSV40非ウイルスT抗原(ATCC TIB116)などのウイルス抗原と反応する抗体を分泌するハイブリドーマである。他のハイブリドーマとしては、腫瘍関連抗原、またはヒトリンパ球抗原に対する抗体、たとえば高分子量のヒト腫瘍関連CEA(ATCC CRL8019)、ヒト腫瘍関連 α -フェトプロテイン、IgG1K(ATCC HB134)、ヒトBリンパ球HLA-DR、単一形IgG2b(ATCC HB104)、ヒトTリンパ球T細胞前駆体IgG1(ATCC CRL8022)、ヒトTリンパ球T細胞サブセットのヘルパーIgG2b(ATCC CRL8002)、Tサブセットの抑制/細胞毒性ヒトIgG1(ATCC CRL8013)、T細胞サブセットの抑制/細胞毒性ヒトIgG2a(ATCC CRL8014)、末梢T細胞のヒトIgG1(ATCC CRL8000)、末梢T細胞のヒトIgG2a(ATCC CRL8001)、胸腺細胞の「共通」ヒトIgG1(ATCC CRL8020)などに対する抗体を分泌するハイブリドーマを例示することができる。

これらの系統、および他の類似の性質を有する系統は、UIGプローブを使用することにより、可変領域をコードしているmRNAを複製するために使用することができる。特に興味深いものは、ヒト腫瘍抗原に対する特異性を有する抗体である。

発現ビヒクルには、プラスミドまたは他のベクターがある。これらの中で好ましいものは、適当な粘着末端を有する可変H鎖またはL鎖配列を容易に挿入することができるように操作された適当な制限部位を有する機能的に完全なヒト定常H鎖またはL鎖配列を担うビヒクルである。したがって、ヒト定常H鎖またはL鎖配列を含有

するビヒクルは、本発明の重要な一態様である。これらのビヒクルは、所望の完全H鎖またはL鎖を適当な宿主内で発現させるための中間体として使用することができる。

好ましい宿主は、酵母である。酵母は、免疫グロブリンL鎖およびH鎖を生産する上で実質的な利点を提供する。酵母は、グリコシル化などの翻訳後のペプチド修飾を行う。現在、所望のタンパク質を酵母において公然と生産させるのに使用することができる強いプロモーター配列および高いコピー数のプラスミドを利用する多くの組換えDNAの計画が存在している。酵母は、クローン化哺乳類遺伝子産物におけるリーダー配列を認識し、リーダー配列を担うペプチド（すなわちアレペプチド）を分泌する〔ヒッツマン（Hitzman）らの11版International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology, モントペリエー（Montpellier）, フランス, 9月13-17, 1982年〕。

酵母遺伝子の発現系は、H鎖とL鎖の産生レベル、タンパク質安定性、および分泌について、常法により評価することができる。酵母をグルコースが豊富な媒質中で増殖させた場合に大量に産生される解糖系酵素群をコードしている活動的に発現される遺伝子由来のプロモーターおよび終止要素を組み込む一連の酵母遺伝子発現系を利用することができる。既知の解糖系酵素群はさらに、非常に効率的な転写制御シグナルを提供することができる。たとえば、イソ-1-チトクロームC（CYC-1）遺伝子のプロモーターおよびターミナーターのシグナルを利用することができる。

クローンした免疫グロブリンのcDNAを酵母内で発現させるために最良の発現プラスミドを評価するには、以下の方法を採用すればよい：

（1）VおよびC領域を結合しているクローンした免疫グロブリンDNAを別の転写プロモーターおよびターミナーターDNAフラグメントに結合する；

（2）このキメラ遺伝子を、タンパク質を過剰生産するのに使用される酵母プラスミド上に配置する〔たとえば、ベグス（Beggs, J.D.）のMolecular Genetics and Yeast, アルフレッド・ベンソン・シンポジウム, 16, コペンハーゲン（1981）を参照のこと〕；

（3）抗体を分泌させるには、酵母リーダーペプチドなどの付加的な遺伝子単位を免疫グロブリンDNA構築物に含有させればよい。

（4）配列の一部（これはしばしば遺伝子配列の最初の6-20コドンである）を、好ましい酵母のコドン・ユーセイジになるように修飾すればよい。

（5）酵母染色体に組込むために使用するプラスミドに、得られたキメラ遺伝子を配置する。

酵母内でL鎖およびH鎖の両者を同時に発現させるためには、以下の方法を採用すればよい。

（1）L鎖およびH鎖遺伝子を各々酵母プロモーターお

よびターミナーター配列に結合し、同一プラスミド上に配置する。このプラスミドを、酵母における自律的な複製、または酵母染色体内の特定部位における組込みのいずれかのために設計すればよい。

（2）異なる選択マーカーを含有する別々のプラスミドにおける酵母プロモーターおよびターミナーター配列にL鎖およびH鎖遺伝子をそれぞれ結合する。たとえば、L鎖遺伝子は、選択マーカーとしてtrp1遺伝子を含有するプラスミドに入れ、他方H鎖遺伝子は、選択マーカーとしてura3を含有するプラスミドに配置すればよい。これらプラスミドは、酵母における自律的な複製用、または酵母染色体内の特定部位における組込み用のいずれかのために設計することができる。これら両選択マーカーを欠いている酵母株を、L鎖遺伝子を含有するプラスミドおよびH鎖遺伝子を含有するプラスミドで同時に、または連続的に形質転換する。

（3）L鎖およびH鎖遺伝子を、（2）に記載の異なる選択マーカーをそれぞれ含有する別々のプラスミドにおける酵母プロモーターおよびターミナーター配列に各々結合させる。L鎖およびH鎖発現プラスミドに見いだされる選択マーカー（上の例ではtrp1およびura3）の「ある」欠損株である酵母交配型をL鎖遺伝子を含有するプラスミドで形質転換し、2つの選択マーカーのうちいずれか一方（上の例ではtrp1）について選択する。「ある」株と同じ選択マーカー（すなわち、例として挙げたtrp1およびura3）を欠いている酵母交配型である「α」株を、H鎖遺伝子を含有するプラスミドで形質転換し、別の選択マーカー（すなわち、上の例ではura3）について選択する。L鎖プラスミドを含有する「ある」株（上の例では、表現型：Trp⁺Ura⁻）、およびH鎖プラスミドを含有する株（表現型：上の例ではTrp⁻Ura⁺）を交配し、上記選択マーカーの両方についてプロトトロフ（prototrophic）である2倍体（diploid）（上の例ではTrp⁺Ura⁺）を選択する。

形質転換用宿主として使用することのできる細菌宿主の中では、大腸菌（E.coli）K12株294（ATCC31446）が特に有用である。他の使用可能な微生物株は、E.coli X1776（ATCC31537）である。既述の菌株、およびE.coli W3110（ATCC27325）、ならびにサルモネラ・チフィウム（Salmonella typhimurium）またはセラチア・マルセスセンス（Serratia marcescens）などの他の腸内細菌、および種々のシュードモナス（Pseudomonas）種を使用することができる。

一般には、宿主細胞と適合する種由来のレプリコンおよび制御配列を含有するプラスミドベクターをこれらの宿主について使用する。それらのベクターは通常、複製部位、および形質転換細胞内での表現型による選択を付与することのできる特殊な遺伝子を含有している。たとえば、E.coliは、E.coli種から誘導されたpBR322〔ポリマー（Bolivar）らのGene, 2:95（1977）〕を使用す

25

ば容易に形質転換される。pBR322は、アンピシリンおよびテトラサイクリン耐性にかかる遺伝子を含有しているので、形質転換細胞を同定するための簡便な手段を提供することができる。pBR322プラスミドまたは他の微生物プラスミドはさらに、微生物が自身のタンパク質を発現するために使用することのできるプロモーターを含有しなければならず、またはそれを含有するよう修飾しなければならない。組換えDNAの構築で最も普通に使用されるプロモーターには、 β -ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）、およびラクトース（ β -ガラクトシダーゼ）プロモーター系〔チェインジ（Chang）らのNature, 275:615（1978）、イタクラ（Itakura）らのScience, 198:1056（1977）〕、ならびにトリプトファンプロモーター系〔ゴードル（Goeddel）らのNucleic Acids Research, 8:4057（1980）、EPO公開番号0036776号〕がある。これらは最も普通に使用されているが、他の微生物プロモーター群も発見されており、利用されている。

たとえば、あらゆるH鎖またはL鎖キメラ免疫グロブリン鎖にかかる遺伝子構築物は、バクテリオファージ入（Pl）の左側プロモーターの制御下に配置することができる。このプロモーターは、制御可能である、最も強い既知のプロモーターの1つである。制御は、入りアレッサーによって行われ、隣接している制限部位が知られている。

また、この免疫グロブリン鎖配列の発現は、形質転換されていない状態における微生物と「ホモローガス」であり得る他の調節配列の制御下にも置くことができる。たとえば、ラクトース依存性E.coli染色体DNAは、 β -ガラクトシダーゼ酵素を同化することによってラクトース消化を仲介するラクトースすなわちlacオペロンを含有する。このlac制御要素は、E.coliを感染するバクテリオファージ入pLAC5から入手することができる。lacプロモーター-オペレーター系は、IPTGによって誘導することができる。

同様に、他のプロモーター/オペレーター系、またはそれらの一部分も使用することができる。たとえば、アラビノース、コリシンE1、ガラクトース、アルカリホスファターゼ、トリプトファン、キシロース、tacなどを使用することができる。他の細菌遺伝子発現制御要素を利用しても、免疫グロブリンタンパク質を発現することができる。たとえば、細菌性分泌シグナルペプチドコード化領域を有する遺伝子を細菌内で発現させれば、シグナルペプチドと通常結合している免疫グロブリンペプチドを分泌させることができる。

他の好ましい宿主は、哺乳類細菌であり、これはインビトロでは組織培養、またはインビボでは動物内で増殖される。哺乳類細胞は、免疫グロブリンタンパク質分子に、リーダーペプチドの除去、H鎖およびL鎖の正しい折り畳みと組み合わせ、正しい部位におけるグリコシル化、ならびに機能的抗体タンパク質のH₂L₂分子としての

26

細胞からの分泌など、翻訳後における修飾を行うことができる。

抗体タンパク質を生産するための宿主として有用であり得る哺乳類細胞には、Vero（ATCC CRL81）もしくはCHO-K1（ATCC CRL61）などのフィブロblast起源の細胞、またはハイブリドーマSp2/O-Ag14（ATCC CRL1581）もしくは骨髓腫P3X63Ag8（ATCC TIB9）などのリンパ球起源の細胞、ならびにそれらの誘導体がある。

クローンしたH鎖およびL鎖遺伝子を哺乳類細胞内で発現させるための幾つかの可能なベクター系が入手可能である。1つのクラスのベクターは、ウシ乳頭腫ウイルス〔サーバー（Sarver, N.）らのProc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 79:7147（1982）〕、ポリオーマウイルス〔ディーンズ（Deans, R. J.）らのProc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 81:1292（1984）〕、またはSV40ウイルス〔ルスキー（Lusky, M. およびBotcham, M.）のNature, 293:79（1981）〕などの動物ウイルスから誘導される自律的に複製する染色体外プラスミドを付与するDNA要素を利用するものである。第2のクラスのベクターは、所望の遺伝子配列の宿主細胞染色体への組込みに依存するものである。それらの染色体に導入されるDNAが安定に組み込まれている細胞は、これも導入された薬物耐性遺伝子、たとえばE.coli gpt〔ムリガン（Mulligan, R. C. およびBerg, P.）のProc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 78:2072（1981）〕またはTn5 neo〔サザーン（Southern, P. J. およびBerg, P.）のJ. Mol. Appl. Genet., 1:327（1982）〕に基づいて選択することができる。選択可能なマーカー遺伝子は、発現させるべきDNA遺伝子配列に直接結合させても、またはコトランスフェクション（cotransfection）によって同一細胞に導入させてもよい〔ウィグラー（Wigler, M.）らのCell, 16:77（1979）〕。

免疫グロブリンcDNAは、抗体タンパク質またはその前駆体をコードしている成熟mRNAになる配列からしか構成されていないので、免疫グロブリンのmRNAを最適に合成するには、遺伝子の転写を調節し、およびRNAをプロセッシングする付加的な遺伝子発現要素が必要である。これらの要素としては、スプライス・シグナル、ならびに誘導プロモーター、エンハンサーおよび終止シグナルなどの転写プロモーターを挙げることができる。このような要素を含有するcDNA発現ベクターとして、オカヤマ（Okayama, H. およびBerg, P.）のMol. Cell Biol. 3:280（1983）、セプコ（Cepko, C. L.）らのCell, 37:1053（1984）、およびコウフマン（Kaufman, R. J.）のProc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 82:689（1985）に記載されているようなものが挙げられる。

免疫グロブリンcDNAを哺乳類細胞内で発現させることについて最適なベクターを評価する方法は、第1に、免疫グロブリンDNAを、細胞ゲノムに安定に組込むか、または染色体外プラスミドとして自律的に複製することのできるベクターに配置させる。このベクターは、異なる

遺伝子発現要素を最適の免疫グロブリン合成について評価するのに使用することができる。

宿主としての哺乳類細胞のもう1つの利点は、ゲノム配列由来のキメラ免疫グロブリン遺伝子を発現するそれらの能力である。したがって、哺乳類細胞は、可変領域cDNAモジュール、およびゲノム配列の全部またはその一部に存在している定常領域から構成されるキメラ免疫グロブリン遺伝子を発現することができる。幾つかのヒト定常領域ゲノムクローンは開示されている[エリソン (Ellison, J.W.) らのNucl. Acids Res., 10:4071 (1982)、またはマックス (Max, E.) らのCell, 29:691 (1982)]。このようなゲノム配列を使用することは、この定常領域遺伝子セグメントと共に、免疫グロブリンエンハンサー、スプライシングシグナル、および転写終止シグナルを同時に導入する場合に便利であり得る。

完全なH₂L₂抗体を得るために、別の方法を行くこともできる。第1に、L鎖およびH鎖を別々に発現させ、次いで精製したL鎖およびH鎖をインビトロで組み合わせ、完全なH₂L₂のIgG抗体とすればよい。細胞内で完全なH₂L₂のIgG分子を生成させるために使用する組み合わせ経路は、広範に研究されている[たとえば、シャルフ (Scharff, M.) のHarvey Lectures, 69:125 (1974)]。リディース (reduced) し、単離したL鎖およびH鎖からIgG抗体を作成するためのインビトロ反応パラメーターは、ベイチョック (Beychok, S.) のCells of Immunoglobulin Synthesis, アカデミック・プレス, ニューヨーク, 69頁, 1979に規定されている。

第2に、細胞内会合 (intracellular association) させ、H鎖とL鎖とを結合させて完全なH₂L₂ IgG抗体にするために、同一細胞においてL鎖およびH鎖を同時発現 (co-express) することが可能である。同時発現は、同一の宿主における同一または異なるプラスミドを使用して起こすことができる。

好ましい態様では、酵母または細菌内で有用である分泌シグナルを利用して同時発現を行う。このような条件下で、完全に折り畳まれ、組み合わされたH₂L₂免疫グロブリンを得ることができる。

さらに、本発明の方法によって、キメラFabフラグメントを調製することができる。

本明細書に記載している方法はさらに、ある特定の特異性の抗体クラスを、これと同じ特異性を有しているが、ヒトまたは非ヒトのいずれか異なるクラスの抗体に切り換えるために使用することができる。たとえば、ヒトIgM抗体は、そのIgM抗体を産生している細胞から入手した可変ヒトcDNA配列を連結したヒト定常IgGcDNAまたはゲノム配列を含有する構築物を調製することによって、ヒトIgG抗体に変換することができる。次いで、これらの構築物を適当な宿主に導入し、発現させる。

ポリペプチド産物

本発明は“キメラ”免疫グロブリン鎖、即ち重鎖また

は軽鎖を提供するものである。キメラ鎖は天然のヒト免疫グロブリン重鎖に存在する不変部と実質上同様の不変部と、所望の任意の抗原特異性を有する可変部とを含有している。可変部の供給源はヒトまたはヒト以外のいずれであってもよい。

本発明はまた、全分子として所望の結合および認識特性を表す、会合 (アソシエート) した重鎖および軽鎖を含有する免疫グロブリン分子を提供するものである。様々な型の免疫グロブリン分子が提供されている: キメラ重鎖と非キメラ軽鎖を有する一価、二価、二特異性 (ジスペシフィック、異なる可変部を有する) 分子、また所望の機能を担持するペプチド部分と結合した可変の結合ドメインを有する分子。

同一または異なる可変部結合特異性のキメラ重鎖と非キメラ (即ち、全部ヒトか、全部ヒトでない) 軽鎖を有する抗体は、必要なポリペプチド鎖が適当に会合することによって製される。これらの鎖はそれぞれ、本発明の組み立て構築法 (モジュラーアセンブリ) によって調製することができる。

キメラFab断片もまた、本発明の一部である。

用途

ヒト不変部を有する本発明の抗体は血清病またはアナフィラキシーショックなどの負の免疫応答がなく、受動免疫、とりわけヒトでの受動免疫に有用である。勿論この抗体を、インビトロでのイメージング用に標識し、従来技術の免疫診断アッセイおよびキットに用いることもできる。この場合、標識としては放射能エミッター、またはC-13分子等のNMRコントラスト物質、または重金属核のようなX-線コントラスト物質であってもよい。この抗体を適当に標識してインビトロの抗原の位置決定に用いることもできる。

抗体はそのまま補体-仲介溶解に、またはトキシシンや他の治療用部分と結合させて治療目的に用いることができる。

抗体のクラス切り替え (スイッチ) は、細胞融合またはハイブリドーマ技術で得られた抗体の会合特性、集合特性または他の特性を変更することが望まれる場合に有用である。例えば、大多数のヒト-ヒトモノクローナルはIgMクラスに属し、それは還元および集合し易いことで知られている。従って、それらの抗体を他の抗体タイプ、例えばIgA、IgG、またはIgEに変更することには大きい利点がある。

混合抗体-酵素分子はELISAのような免疫診断法に用いることができる。混合抗体-ペプチドエフェクター-抗体を用いてエフェクター部分を高い効率で、かつ高い特異性で標的細胞に到達させる (デリバリー) ことができる。

このように本発明の総合的な記述がなされたので、以下の幾つかの具体的な実施例により、本発明をよりよく理解できるであろう。これらの実施例は例示を目的とす

10

20

30

40

50

るにすぎず、特に記載ない限り、制限的な意図ではない。

実験例

材料および方法

組織培養細胞系統

ヒト細胞系統(セルライン) GM2146およびGM1500をHuman Mutant Cell Repository (Camden, New Jersey) から入手し、RPMI1640+10%ウシ胎児血清(M.A. Bioproducts)中で培養した。American Type Culture CollectionからSP2/0細胞系統およびCRL8017細胞系統を得、ダルベッコの改良イーグル培地(DMEM)+4.5g/lグルコース(M.A. Bioproducts)+10%ウシ胎児血清(Hyclone, Sterile Systems, Logan, Utah)中で培養した。培地にペニシリン/ストレプトマイシン(Irvine Scientific, Irvine, California)を補充した。

組織換え血漿およびバクテリオファージDNA類

プラスミドpBR322、pL1およびpUC12をPharmacia P-L Biochemicals (Milwaukee, Wisconsin) から購入した。プラスミドpSV2-neoおよびpSV2-gptはBRL (Gaithersburg, Maryland) から得、また、American Type Culture Collection (Rockville, Maryland) から入手可能である。pHu-gamma-1はヒトIgG1染色体遺伝子の8.3kb Hind III-BamH I断片のサブクローンである。ヒトIgG1染色体遺伝子の別々の単離はエリソンら[Ellison, J.W., Nucl. Acids Res., 10:4071 (1982)]によって示された。M8alphaRX12はM13mp10に挿入されたM603染色体遺伝子のJ-Cイントロン領域[デイヴィスら(Davis, M.), Nature, 283:733]由来のマウス重鎖エンハンサーを含有している。G-テイル化pUC9をPharmacia P.L. から購入した。浮遊密度遠心によるプラスミドDNAの精製、制限エンドヌクレアーゼ消化、アガロースゲル電気泳動によるDNA断片の精製、結合(ライゲーション)および大腸菌の形質転換等を含むDNA操作はマニアティスら[Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (1982)]の記載に従って行われた。制限エンドヌクレアーゼおよび他のDNA/RNA装飾酵素はベーリンガー・マンハイン(Indianapolis, Indiana)、BRL、New England Biolabs (Beverly, Massachusetts) およびPharmacia P.L. から購入した。

オリゴヌクレオチド調製

オリゴヌクレオチドは、イトウら[Ito, Nucl. Acids Res., 10:1755 (1982)]のトリエステル法で合成するか、ELESSEN (Los Angeles, California) から購入した。トリチル化し、脱保護したオリゴヌクレオチドをセファデックス-G50で精製した後、C18 uBondapakカラム(Waters Association)を用い、10mM トリエチルアミン酢酸、pH7.2中、0-25%アセトニトリルグラディエントを用いる逆相HPLCにかけた。80%酢酸中で30分間脱トリチル処理した後、3回蒸発させた。オリゴヌクレオチドを[ガンマー-³²P] ATP+T4ポリヌクレオチドキナーゼ

で標識した。

RNAの調製および分析

アウフレイおよびローゲン[Auffray, C. and Rougeon, F., EYR. J. Biochem., 107:303 (1980)]またはチャーギンら[Chirgwin, J.M., Biochemistry, 18:5294 (1979)]の方法によって組織培養細胞から全細胞RNAを調製した。ポリ(A)+RNAの調製、メチル水銀アルガロースゲル電気泳動、およびニトロセルロースの“ノーザン”トランスファーはマニアティスら(前掲)の方法に従って行われた。まずRNAをホルムアルデヒド処理することにより、全細胞RNAまたはポリ(A)+RNAをニトロセルロースに直接結合させた[ホワイ特(White, B.A.)およびバンクロフト(Bancroft, F.C.), J. Biol. Chem., 257:8569 (1982)]。フィルターに結合したRNAのハイブリザイゼーションは、[マーグリーら(Margulies, D.H.), Nature, 295:168 (1982)]の条件下、ニックトランスレーションしたDNA断片というか、または³²P標識オリゴヌクレオチドと、4×SSC、2×Denhardt's, 100μg/ml サケ精子DNAを用いて37℃で一夜、次いで37℃の4×SSC中で洗浄して行った

cDNAの調製およびクローニング

オリゴ-dTプライムcDNAライブラリーを、GM1500およびGM2146細胞由来のポリ(A)+RNAから、それぞれランドら[Land, H., Nucl. Acids Res., 9:2251 (1981)]およびガブラーおよびホッフマン[Gubler, V. and Hoffman, B.J., Gene, 25:263 (1983)]の方法で調製した。cDNAライブラリーは、上記条件を用いる³²P-標識オリゴヌクレオチドとの系中ハイブリザイゼーション(マニアティスら、前掲)、またはドゥ・ランゲら[de Lange, Cel. 1, 34:891 (1983)]の条件を用いる、ニックトランスレーションしたDNA断片とのハイブリザイゼーションに付した。

オリゴヌクレオチドプライマー伸長およびクローニング

ポリ(A)+RNA (20μg)を64mM KCl (40μl)中、プライマー1.2μgと混合した。90℃で5分間変性した後、氷冷し、1M Tris-HCl (pH8.3) 3μl中のヒト胎盤リボヌクレアーゼインヒビター(BRL) 3単位を加えた。42℃で15分間、オリゴヌクレオチドをRNAにアニーリングさせ、0.05M DTT、0.05M MgCl₂、および各1mMのdATP、dTTP、dCTPおよびdGTPを加えた。アルファ-³²P-dATP (2μl, 400Ci/mmol New England Nuclear)、次いでAMV逆転写酵素3μl (19単位/μl, Life Science)を加えた。

42℃で105分間インキュベーションした後、2μlの0.5MEDTAと50μlの10mM Tris、1mM EDTA、pH7.6を加えた。取り込まれなかったヌクレオチドをセファデックスG-50スパンカラムクロマトグラフィーで除去し、RNA-DNAハイブリッドをフェノール、次いでクロロホルム抽出し、エタノールで沈澱させた。第2鎖合成、dCTPまたはdGTPによるホモポリマーテイルリング、およびホモ

3.1

リマーテイル化ベクターの挿入はガブラーおよびホフマン（前掲）記載の方法で行われた。

部位特異的突然変異誘発

一本鎖M13サブクローンDNA（1 μ g）をHinバッファー（7mM Tris-HCl（pH7.6）、7mM MgCl₂、50mM NaCl）12.5 μ l中、オリゴヌクレオチドプライマー20ngと結合させた。密封した管内で95°Cに加熱した後、70°Cから30°Cまで90分、ゆっくりと冷却することによりプライマーと鋳型のアニーリングを行った。dNTP類（各1mM）2 μ l、³²P-dATP（10 μ Ci）1 μ l、DTT（0.1M）1 μ l、およびクレノウDNA Pol I（0.4 μ l、2u、ペーリンガー・マンハイム）を加え、37°Cで30分間、鎖を伸長させた。ここに13リバースプライマー（New England Biolabs）1 μ l（10ng）を加え、加熱／アニーリングと鎖伸長工程を繰り返した。0.5M EDTA（pH8）2 μ l + 10mM Tris-HCl（pH7.6）、1mM EDTA 80 μ lを加えて反応を停止した。生成物をフェノール抽出し、セファデックス-50スパンカラムクロマトグラフィーで精製し、エタノールで沈澱させた後、制限酵素消化および適当なベクターとのライゲーションに付した。

骨髄腫組織培養細胞のトランスフェクション

オチら [Ochi, A., Nature, 302:340 (1983)] の方法の変法でプロトプラスト融合を行った。A₅₀₀=0.7のバクテリア50 μ lをサンドリー・ゴルジンら [Sandri-Goldin, R.M., Mol. Cell. Biol., 1:743 (1981)] の方法によりプロトプラストに変え、次いで、DMEM+10%FBS 20 μ lで希釈した（終容量25 μ l）。Sp2/O細胞を収穫し、2,200 \times gでベレット化し、洗浄し、再ベレット化し、DMEMに2-5 $\times 10^6$ / μ lとなるように再懸濁した。細菌のプロトプラスト（10 μ l）を10 $\times 10^6$ Sp2/O細胞と混合し、22°Cにおいて4,000 \times gで20分間遠心してベレット化した。上清をピペットで除去し、管を軽く払って残存する数滴の培地にベレットを懸濁した。混合しながら45秒間でDMEM中10%DMSO、37%（w/v）PEG6000（Kodak）2 μ lを滴下して加えた。15秒後、DMEM中42%PEG6000（2 μ l）を45秒間で加えた。混合しながら、完全DMEM（45 μ l）をゆっくり加えた。2500 \times gで細胞をベレット化し、3回、洗浄およびベレット化を行った。

ポッターら [Pötter, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:7161 (1984)] の電気穿孔法を用いた。トランスフェクション後、細胞を完全DMEM中、48-72時間で回復させた後、選択培地の存在下、96ウェル培養のアプレートのウェルあたり10,000から50,000細胞を蒔いた。G418（GIBC）選択は、0.8mg/ml、マイコフェノール酸（Cakbiochem）は6 μ g/ml + 0.25mg/ml キサンチン、およびHAT（シグマ）は標準濃度であった。

免疫グロブリン合成と分泌の検定

分泌された免疫グロブリンは、組織培養細胞上清から、直接測定された。1 $\times 10^6$ 細胞を160 μ lの1%NP40、0.15M NaCl、10mM Tris、1mM EDTA、pH7.6中、0°C

3.2

で15分間ボルテックス攪拌した後、10,000 \times gで遠心して不溶性物質を除去し、細胞質タンパク質の抽出物を調製した。

アフィニティー精製した抗血清を用いる二重抗体サンドイッチELISA [ボラーら (Voller, A.), Manual of Clinical Immunology, 2nd Ed., Eds. Rose, N. and Friedman, H., 359頁-371頁, 1980] によって特異的な免疫グロブリンを検出した。ヒトIgGの検出のための、アプレート

結合抗血清は1/1000希釈したヤギの抗ヒトIgG（KPL, Gaithersburg, Maryland）であり、ペルオキシダーゼ結合抗血清は1/4000希釈したヤギの抗ヒトIgG（KPLまたはTago, Burlingame）である。ヒト免疫グロブリンカッパを検出するための、アプレート結合抗血清は1/500希釈したヤギの抗ヒトカッパ（Tago）であり、ペルオキシダーゼ結合抗血清は1/1000希釈したヤギ抗ヒトカッパ（Cappel）である。

B型肝炎の表面抗原と結合する抗体は市販の検定法（アボット、AUSAB）で検出された。

実施例

以下の実施例はヒト不変部と非ヒト可変部とを有するキメラ抗体の調製に関する。これらの実施例はキメラ抗体の着実な製造工程の概要を示すものである。

実施例1: ヒト抗体不変部遺伝子変更およびcDNA発現ベクター

(1) 重鎖ヒト不変部のためのcDNAクローン、およびそれを含有するビヒクルの調製

mRNAの調製およびcDNAクローニングの供給源として細胞系統（セルライン）GM2146を用いた。この細胞系統はIgG1を分泌する [シモンズら (Simmons, J.G.), Scand. J. Immunol., 14:1-13, 1981]。この細胞系統の試験は、それがIgGと同様IgAをも分泌することを示唆していた。

この細胞系統をクローニングした結果は、6個のサブクローンの内5個がIgGのみを分泌し、6個のサブクローンの内1個がIgAのみを分泌することを示唆していた。この細胞系統からポリ(A)+RNAを調製し、ガブラーおよびホフマン [Gubler, U. and Hoffman, B.J., Gene, 25:263-269 (1983)] の方法でポリ(A)+RNAからcDNAライブラリーを調製した。大腸菌株HB101およびRR1に導入したcDNAの最初の平板培養で合計1500のコロニーを得、それをヒトIgG1のゲノムクローン (pHu-gamma-1) のHind III-BamH I断片とハイブリダイゼーションさせた。4個の陽性クローンが認められた。これらクローンの1つ、pGMH-3（第4図）のCH3暗号領域含有断片を用いて元のライブラリーと約5000コロニーの新しい形質転換体とと一緒に、再度、スクリーニングした。最大クローン内、2個、pGMH-6およびpGMH-15を制限酵素消化して分析した（第4図）。両クローン共に、完全なヒトIgG1の不変部を含有していたが、pGMH-6は、明らかにIgG1cDNA配列に影響のない、pBR322DNAの約1500

塩基対を欠失していることが分かった。

クローンpGMH-6は重鎖可変領域のクローニングのためのクローニングベクターを構築するためのIgG1不変部変更 (module) を提供する。

(2) 軽鎖ヒト不変部のためのcDNAクローン、およびそれを含有するビヒクルの調製

初期クローニング期のためにIgG2Kを産生するヒト細胞系統 (GM1500) を選択した。GM1500から調製したポリ (A) ⁺RNAはウサギ網赤血球抽出物を用いるインビトロでのトランスフェクションにおいて活性である。ランドラ [Land, Nucl. Acids Res., 9:2251-2266 (1981)] の方法に従い、Kpn I消化し、dGテイル化したpQ23をクローニングベクターに用いて、このRNAからcDNAライブラリーを調製した (第5図)。このベクターはpBR322のBamH I部位とSal I部位との間に挿入されたBgl II、Kpn IおよびSst I部位を含有している。

軽鎖mRNAに対応するGM1500RNAから生成したcDNAクローンの同定のために、DNAプローブ、UIG-HuKを合成して精製した。UIG-HuKオリゴヌクレオチドは式: 5' -AGCCACAGTTCGTTT-3' で示され、あらゆる機能的なヒトカッパmRNA種と、そのJ-Cジャンクションでハイブリダイゼーションするように設計されている。このプローブを用いてジデオキシヌクレオチドおよび逆転写酵素の存在下、GM1500RNA上でのcDNA合成を開始 (プライム) した。全GM1500ポリ (A) ⁺RNA 1.2μgをこの実験に用い、J配列全てとV領域の幾らかが読み取られ、(1) GM1500は無傷である、(2) カッパプローブの配列は正しい、(3) GM1500軽鎖mRNAはJκ4配列を含有している、ということが証明された。

軽鎖プローブとのハイブリダイゼーションが陽性であるcDNAクローンを選択した。プローブはJ-Cジャンクションとハイブリダイゼーションしているの、クローンがJ領域に加えて完全な不変部を有するか否かを決定することが最も重要な点であった。

2個の最大カッパcDNAクローンの挿入サイズは、0.6kbと0.9kbであり、制限酵素マッピングによって、両クローンに全不変部暗号配列が存在していることが分かった (第6図)。pBR325のBcl I部位に、ヒトカッパ不変部とJ領域とを含むSau3A断片を挿入することにより、ヒトカッパcDNAクローンpK2-3を用いて軽鎖不変部ベクターpING2001を作成した (第6B図)。

JジャンクションにHind III部位を配置することでヒトカッパcDNAクローンの変異体を作成した。これはJκHIND IIIオリゴヌクレオチドプライマーを用いるインビトロ突然変異誘発によって行われた (第7C図)。得られたプラスミドはpGML60である。

ベクターpING2003はcDNA配列の哺乳類細胞へのトランスファーおよび発現のために構築された (第10図)。このベクターは、pUC12と、SV40配列を含有する2個のプラスミドから構築された、pL1はSV40早期領域プロモ-

ーターとSV40後期領域スプライス配列を提供する。pSV2-neo配列は哺乳類細胞の形質転換のための選択可能マーカーとSV40ポリアデニル化シグナル配列を提供する。pUC12はcDNA挿入のための複数クローニング部位を提供する。

pING2003ベクターは改良のために有用な数個の制限部位を有する。それらにはエンハンサー配列の挿入に有用なHind III部位、他のプロモーター配列の挿入に有用なHind IIIからXho I断片が含まれる。このベクターは哺乳類細胞でのcDNA遺伝子の発現に有用である。

pING2003へのエンハンサー要素の付加

免疫グロブリンのエンハンサー要素 (エレメント) は、安定に形質転換されたマウス骨髄腫細胞内で、近くの遺伝子の転写を数百倍促進することが示された [ギリーズら (Gillies, S.D.), Cell, 33:717, 1983; およびバネルジラ (Banerji, J.), Cell, 33:729, 1983]。マウス-ヒト免疫グロブリン遺伝子のマウス骨髄腫細胞内での発現を容易にするためにマウス免疫グロブリン重鎖エンハンサー要素をcDNA発現ベクターpING2003に加えた (第10図)。マウス重鎖エンハンサー領域DNAはマウス重鎖ゲノムDNA (M8-アルファ-RX12, Deans, R.J. 未公開) のM13サブクローンから単離された。このサブクローンのSal I+EcoR I消化で単離されたDNAをHind IIIリンカーで修飾し、pING2003のHind III部位に挿入し、新しいcDNA発現ベクターpING2003Eを得た。このベクターは哺乳類細胞、特にマウス骨髄腫またはハイブリドーマ細胞系統内でのcDNA遺伝子の効率的な発現に有用である。

実施例2: ヒト-マウス キメラ 抗-HBsAg抗体鎖

(1) 重鎖マウス抗-HBsAg可変領域のcDNAクローンおよびそれを含有する媒体の調製

セルラインCRL8017をATCCから入手し、サブクローンした。サブクローンを増殖させ、市販の抗-HBsAg検出キットを用いてマウスIgG抗-B型肝炎結合活性について試験した。3つのポジティブなサブクローンが見い出された。ポリ (A) ⁺RNAをこれらのサブクローンの1つから調製し、メチル水銀アガロースゲルで分画した。このRNAは、κUIG-MJKプライマーへの、およびマウス重鎖UIG-MJH3プローブへの特異的なハイブリダイゼーションから推量すると、無傷の軽鎖および重鎖mRNAを含有していた (第7図を参照)。さらに、UIG-MJKプライマーを、ジデオキシ配列決定反応において抗-HBsAgポリ (A) ⁺RNAの特異的なプライムに用いた。十分な配列を解読し、抗-HBsAgセルラインの主κRNAがJκ2配列を含んでいることがわかった。

抗-HBsAgポリ (A) ⁺RNAにおいて重鎖および軽鎖UIGプライマーを用いることによって、可変領域cDNA合成の条件を最適にした。ジデオキシ鎖延長の実験により、マウスUIG-MJKプライマーおよびUIG-JH3プライマーが正確にκおよび重鎖RNAをプライムすることが示された。

35

ジデオキシヌクレオチドの非存在下で逆転写を行うと、 κ UIG-MJKプライマーを用いたときの主要な産物は410 \pm 20ヌクレオチドのフラグメントであり、一方、重鎖UIG-JH3プライマーを用いたときの主要な産物は430 \pm 30ヌクレオチドのフラグメントであった。これらは、 κ の可変および5'非翻訳化領域、並びに重鎖免疫グロブリンmRNAの予想される長さ一致している。CRL8017細胞由来のポリ(A)⁺RNAの最適プライムのための条件は、モノクローナル抗体を産生するあらゆるセルラインから単離されたポリ(A)⁺RNAに対してうまく適用されるはずである。

オリゴヌクレオチドプライマーによってハイブリドーマmRNAをプライムするための最適条件を決定した後に、2種類のオリゴヌクレオチドを設計し、重鎖V領域cDNAの合成に用いた。これら2種類のオリゴヌクレオチドはUIG-MJH3STE II (13) およびUIG-MJH3である(第7図および第8図)。このプライマー配列が、BstE II認識部位(GGTGACC)をクローン中に導入するために設計されたものであり、従って、これをこの部位のところでヒトIgG1の不変モジュールと、後者のJ領域の類似の位置で結合させることができることに注意すべきである。この場合、このプライマーは、J_H3暗号配列を用いるマウスのmRNA配列とは唯一個のGとUの誤対合を有していた。UIG-MJH3STE II (13) プライマーは13塩基の長さであり、誤対合の残基は5'側の7対合と3'側の5対合にはさまれていた。これは13-merのBstE IIプライマーであった。13-merのBstE IIオリゴヌクレオチドのプライム効率を調べるために、マウスJ_H3に特異的な21-merプライマー(UIG-MJH3)を用いた。このプライマーはその3'末端の17ヌクレオチドについては完全な対合を有していた。

これら2種類のプライマーおよびJ_H3暗号配列を第8図に示す。13-merBstE IIプライマーおよび21-merJ_H3プライマーによって得られた第1鎖cDNA産物は、完全なV_H領域である約430ヌクレオチドのバンドを含んでいた。使用した標準的なプライム条件下では、13-merBstE IIのプライム効率は21-merJ_H3の効率よりかなり劣っていた。従って、GublerおよびHoffmanの方法(上記)を用いて、これらプライマーのそれぞれからの第1鎖合成によってcDNAライブラリーを作成した。

始めに、21-merJ_H3ライブラリーを21-merJ_H3オリゴヌクレオチドでスリーニングした。ラングら[de Lange, T. et al., Cell, 34:891-900 (1983)]に従い、30'で一晩、フィルターハイブリダイゼーションを行った。次いで、このフィルターを6xSSC、0.1%SDS中、51'で洗浄した。5つのコロニーを選択した。最大のものは約460bpの挿入を有していた。もっと重要なことは、それが既知のJ_H3配列から予想される3つの制限部位を、プライマー配列の上流に含んでいたことである。このクローンpJ3-11を、鎖終止法[ワレスら(Wallace, R. B. et

36

al., Gene, 16:21-26 (1981))]によりJ_H3プライマーを用いて配列決定した。得られた配列は残存のJ_H3暗号セグメントを有していた。すぐ上流の13-ヌクレオチドセグメントは、公表されているDセグメント配列(Dsp 2.2) [クロサワら(Kurosawa, Y. et al., J. Exp. Med., 155:201 (1982))、およびトネガワ(Tonegawa, S., Nature, 302:575 (1983))]に適合していた。この領域から予想されるノナペプチドは、重鎖分子のFR3を構成する、アミノ酸残基86-94の公表されたマウスの重鎖Vサブグループと相同であるという特徴を示した。プラスミドpJ3-11は転位したVDJ配列を示し、このセルラインによって産生される抗-肝炎V_H配列を含んでいることは明らかである。

次いで、265ヌクレオチドの長さの、Alu IからSau96 Iまでの、J領域中にBstE II部位を有するV_H領域のcDNAクローンを単離するために、pJ3-11由来のプロープを用いて13-merのBstE IIプライマーから得たcDNAライブラリーをスクリーニングした。6つのポジティブなクローンを単離した。最大のpBs13-1をさらに分析した。挿入は280ヌクレオチドの長さであり、その制限地図は、導入したBstE II部位を除いてpJ3-11のものと一致していた。第9図は、これら2つの挿入体をどのように組み換えてpMVHCa-13、即ちモジュール結合のBstE II部位を有するV_Hクローンを得たかを示すものである。3種類の別のV_HcDNAクローンを、BstE II部位を含む21-merのオリゴヌクレオチドUIG-MJH3STE IIプライマーから得たcDNAライブラリーから単離された。これらのクローンは、ヒトC_H配列に結合させるための別のV_HcDNA配列を提供する。

(2) 軽鎖マウス抗-HBsAg可変領域のcDNAクローンおよびそれを含有する媒体の調製

J_K2配列は抗-肝炎ハイブリドーマセルラインから調製したmRNA中に存在するので、オリゴヌクレオチドUIG-JK2BGL II (第7B図)を設計してBg III部位をJ_K2領域中に導入した。Bgl IIによる消化は、次に前記のヒトC_KベクターpING2001のBcl I部位に、V_KcDNA暗号領域を直接挿入することを可能にする。この挿入によって、マウスの可変領域セグメント(J領域を含む)がヒト κ 不変領域セグメントに正確に結合することになる(それぞれが適切な暗号フレーム中にあり、マウス可変領域またはヒト不変領域のいずれのアミノ酸配列においても変化はない)。

JK2BGL IIオリゴヌクレオチドを用いて抗-HBsAgmRNAをプライムし、pUC9において、重鎖に対する(上記)のようなcDNAライブラリーを得た。クローニングの前にポリアクリルアミドゲル電気泳動によりcDNAを大きさによって選別し、80%のcDNAクローンは長さ300-750ヌクレオチドの挿入体の大きさを有することがわかった。このライブラリーのレプリカフィルターを、2種類のオリゴヌクレオチド、即ち元のプライマーおよび元のプライマー

37

の5'のJ_K2配列に相補性である第2のアローブでスクリーニングした。

抗-B型肝炎モノクローナルセルラインCRL8017が少なくとも2種類の別の軽鎖を有する免疫グロブリンを分泌することがわかった。その1つは、抗-B型肝炎セルラインを得る際の融合相手として用いたミエローマNS-1から導かれる。NS-1はミエローマMOPC21から導かれるので、MOPC21 V_KmRNAが抗-肝炎モノクローナルセルライン由来のV_KcDNAライブラリー中に存在する可能性を調べた。実際に、分析した1つのcDNAクローン (p6D4 B) は、挿入されたBgl II部位を除いてMOPC21V_KcDNAの制限酵素地図と同一の地図を有している。

これらの結果から2つの結論を導くことができる。その第1は、オリゴヌクレオチドを用い、ハイブリドーマセルライン由来のV_K領域をクローニングしながら制限酵素部位を効率的に導入することができるということである。その第2は、多数のV領域配列 (その1つだけが所望の配列である) の存在についてハイブリドーマセルラインを注意深くモニターしなければならないということである。

このセルラインのmRNA中に存在する κ 軽鎖J領域の特徴をさらに調べるために、ポリ (A) ⁺RNAを、ホワイトら [White and Bancroft, J. Biol. Chem., 257:8569 (1982)] のホルムアルデヒド「ドットプロット」法によってニトロセルロースに結合させた。RNAを、それぞれの機能的な κ J領域に特異的な³²Pラベルしたオリゴヌクレオチドアローブにハイブリダイズさせた。これらのアローブを、UIGアローブ5JK1、MJK、5JK4、および5JK5として第7B図に示す。この結果は、mRNAがMJKおよび5JK*

38

*4の両オリゴヌクレオチドアローブに強くハイブリダイズすることを示し、J_K2およびJ_K4の両配列が存在していることを示した。J_K2mRNAは、親のハイブリドーマ相手NS-1から導かれるものとして前に固定されていたので、J_K4mRNACRL8017細胞の抗-肝炎結合特異性をコードしているものと結論された。

2つの別のcDNAライブラリーをスクリーニングしてJ_K4配列をコードしているV領域クローンを単離した。第1のものは、JK2BGL II (上記) によってプライムされた。第2のものは、J_K4mRNAに特異的な、クローンしたV領域のJ領域中にBgl II部位を導入する、オリゴヌクレオチドアプライマーJK4BGL IIを用いて作成した。このJK4BGL IIプライマーを第1鎖cDNA合成をプライムするために用い、クローニングの前にcDNAを大きさによって選択しなかったこと以外はJK2BGL IIプライムしたcDNAライブラリーを作成するために用いた方法と同じ方法を用いて、cDNAライブラリーを作成した。

第7B図は、それぞれのプライマーが有している他の機能的なマウス κ J領域配列との誤対合を表にしたものである。J_K4はJK2BGL IIプライマーと比較すると21個のヌクレオチド中に5個の誤対合を有し、JK4BGL IIプライマーとは23個中に3個有していることに注意が必要である。

両ライブラリーを、J_K4配列に特異的なオリゴヌクレオチドアローブ (5JK4) とハイブリダイズさせることによって、J_K4配列を含んでいるV領域クローンについてスクリーニングした。このスクリーニングの結果を第1表に示す。

第 1 表 *

ライブラリー	プローブの特異性	
	J _K 2	J _K 4
JK2BGLII	2% (30/1500)	0.15% (2/1500)
JK4BGLII	N/D	3.5% (31/875)

*J_K2またはJ_K4配列とV領域を含有するクローンの割合(%)。

使用したプローブは、オリゴヌクレオチド5JK4 (J_K4特異性、第7図) およびp6D4B [NS-1 (MOPC21) V領域配列を含む] である。N/Dは測定せず。

両ライブラリーから単離したいくつかのJ_K4 V領域cDNAクローンの特徴を調べた。これらのクローンは、同一の制限酵素地図を有しており、オリゴヌクレオチドア

*イムしたcDNAクローニング操作に由来するBgl II部位を含んでいる。1つのクローンpV17の配列および制限地図は、pV17がV領域遺伝子配列を含有していることを示

す。

これらの結果は、JK2BGL IIプライマーがJ_K4 mRNA配列を効率的ではないが正しくプライムすることができることを示すものである。JK2BGL IIプライマーはJ_K4 mRNAとよりも他のあらゆるJ_K領域mRNAとの誤対合の方が少ないので(第7B図)、他のJ_KmRNAはJK2BGL IIプライマーを用いて一層効率的に正しい位置でプライムされることが予想される。即ち、あらゆる機能的なマウス κ V領域の効率的なcDNAクローニングを、JK2BGL IIおよびJK4BGL IIプライマーの混合物を用いることによって得ることができる。

V領域のcDNAクローニング中にJ領域中にBgl II部位を配置することは、クローンしたマウスのV領域遺伝子モジュールをヒト κ 不変領域遺伝子モジュールに結合させることを可能にする(第9B図)。

上記の実験を行った後に、cDNAクローンpV17が完全な5' 暗号領域を欠いていることがわかった。ヌクレオチドの配列決定によって開始コマンドATGのAがpV17中にコピーされていないことがわかった。2つの他のcDNAクローンは同じ欠損を有していたので、これはランダムなcDNAクローニングの人工産物ではなかった。2つの方法を提案し、完全な5' 暗号領域を有する軽鎖遺伝子を得た。

第1には、始めに5' 末端から155塩基のpV17配列に相補的なオリゴヌクレオチド(5' -ATATTGCTGATGCTCT-3')でプライムすることによって新規なcDNAライブラリーを作成した。このライブラリーから、pV17 DNAフラグメントプローブとハイブリダイズするクローンを選択した。これら新規なcDNAクローンのいくつかは、イニシエーターのATGと、5' 非翻訳化領域の20ヌクレオチドを有していた。これらクローンの1つp2-21HA、23ヌクレオチドの5' の非翻訳化領域と完全なATG開始コドンを提供する。p2-12をpV17由来の配列と組合わせると、完全な5' 末端を有する可変領域が得られる(pING2013E)。

第2には、既存の軽鎖クローンの部位指向性の突然変異誘発を用いて、同時に、ポリ-G領域を除去し、開始ATGに隣接させてリボソーム認識配列を配置した。pV17由来のPst IフラグメントをM13mp18中にサブクローンした。次に、オリゴヌクレオチド(V17-IVM; 5' -GTGTGCTACTCAGCATGAGGTTCCAGGTTCT-3')を、pV17配列を突然変異させるためのプライマーとして用いて、pV17配列中にSal I部位と開始ATGを含有させた。得られたプラスミドpV17-IVMは、ヒト不変領域モジュールに連結するための別のマウス可変領域を与えた。

次いで、pV17由来の可変領域の完全なヌクレオチド配列を決定した。この配列は、pV17がいくつかの保存アミノ酸を含むV_K-J_K連結領域、およびJ_K4 RNAをUIG-JK2BGL IIオリゴヌクレオチドでプライムすることによって得たハイブリッドのJ_K2/J_K4領域を含んでいることを示

した。しかし、V_KおよびJ_K領域が同じ暗号フレーム中ではないため、pV17中のV_K領域は機能的ではない。従って、pV17のV領域が翻訳されると、J領域が正しくないフレームで翻訳される異常な免疫グロブリン軽鎖が得られることになる。この欠損は異常なV-J結合によって引き起こされ、ケリーら[Kelley, D.E. et al., Mol. Cell. Biol., 5:1660-1675 (1985)]が観察したような非機能的な κ mRNAが得られることになる。

pV17のV領域は異常な免疫グロブリンをコードしているので、この軽鎖が機能的な抗-肝炎抗体分子の一部である可能性は極めて低い。これらの結果は、V領域をコードしている多数のRNA種(その1つだけが所望の配列である)の存在についてハイブリドーマ細胞をモニターすることの重要性を示すものである。

CRL8017 cDNAライブラリーのスクリーニングをさらにに行い、これまでに発見した2つのV_KcDNAクラス(MOPC21-p6D4B、pV17)のどちらから由来するものでもないV_KcDNAクローンを探した。始めに、CRL8017 RNAから作成したオリゴ-dTプライムcDNAライブラリーを、 κ 不変領域に特異的なDNAフラグメントプローブで、およびそれとは別にMOPC21およびpV17 V_K領域に特異的なプローブでスクリーニングした。 κ 不変領域を含有しているが、MOPC21またはpV17のものとは異なるV_K領域を有するcDNAクローン(p1E9L-81)を見い出した。このオリゴ-dTプライムしたcDNAライブラリーのスクリーニング法は、ニックトランスレーションされた比活性の高いプローブを用いるので、cDNAライブラリーのオリゴヌクレオチドスクリーニングの別の有用な方法である。また、この方法は適切なプローブを選択することによって、いくつかのクラスのV領域クローン、例えばすべてのV_Kクローンを同時に単離することを可能にする。第2に、CRL8017 RNAから作成したUIG-JK2BGL IIプライムのcDNAライブラリーをUIG-5JK2オリゴヌクレオチドプローブ(第7図を参照)でスクリーニングした。新しいクラスのV_KcDNAクローンを見い出した: この群のクローンはp1E9L-81と相同であり、UIG-5JK2プローブとはハイブリダイズするが、MOPC21 V_Kプローブとはしない。また、これらクローンの制限エンドヌクレアーゼ部位地図およびヌクレオチド配列は、CRL8017細胞由来のMOPC21相同性のV_KcDNAクローンとは異なっている。しかし、これらのクローンは、非機能的なmRNAが得られることになる異常なV-J結合を有しており、キャビリーら[Cabilly and Riggs, Gene, 40:157 (1985)]が記載しているものと同一のようである。

従って、抗-B型肝炎セルラインCRL8017は、上記のcDNAクローンp6D4B(MOPC21)、p1E9L、およびpV17に対応する少なくとも3クラスのV_KmRNAを有しているものと結論した。p1E9LおよびpV17クローンは異常に転位した κ 遺伝子由来のmRNAから導かれ、一方、p6D4Bクローンは親ハイブリドーマの融合相手NS-1から導かれる。

これらクローンのいずれも所望の抗-肝炎軽鎖をコードしていないようである。

(3) ヒト不変/マウス可変領域を含有する重鎖の調製および発現

pMVHCa-13中のV領域配列を、ヒトIgG1不変(C)領域クローンpGMH-6に連結した。pGMH-6のIgG1 CH1領域内に第2のBstE II部位が存在することにより、多工程のライゲーションが必要であった。第1に、pGMH-6のJ-CH1からの220のヌクレオチドのBstE IIフラグメントを、pGMH-6の1100ヌクレオチドのIgG領域BstE II 10 ~BamH Iフラグメントにライゲートした。別のライゲーションにおいて、マウスのV領域を含有するpMVHCa-13の420ヌクレオチドのBstE II~BamH Iフラグメントを、ウシ腸ホスファターゼ処理したBamH Iプラスミドベクターに連結した。次いで、この2つのライゲーション液を合わせ、リガーゼを加え、そしてその生成物をHB101に導入して、キメラ性のマウスV-ヒトCクローンpMVHCc-24を得た(第9A図)。

pMVHCc-24中のハイブリッド重鎖遺伝子のV領域を、部分配列分析によってさらに調べた。この分析によつて、クローンしたV領域が既知のD配列DSP2.2(クロサワおよびトネガワ、上記)に合致するD配列を含有していることがわかった。また、この配列は、既知のマウスV重鎖リーダーペプチド配列に類似する19アミノ酸のリーダーペプチド、および少なくとも3ヌクレオチドの5'非翻訳化領域を予想させた。

pMVHCc-24のマウス-ヒトハイブリッド重鎖遺伝子を含有するBamH IフラグメントをBamH I消化のpING2003E *

*ベクター中にクローンし、発現プラスミドpING2006Eを得た(第11図)。このpING2006Eプラスミドは、マウス重鎖のエンハンサー領域の存在により、Bリンパ球におけるマウス-ヒト キメラ免疫グロブリン遺伝子の効率的な発現の蓋然性が増加しているはずである。

pMVHCc-24中に存在するキメラ重鎖遺伝子の修飾を行って、イニシエーターATGの前のオリゴ-dC領域を欠く別の重鎖遺伝子を得た。このpING2012EとpING2006Eベクターは、第12図に示すように、ATGの直前のヌクレオチドを除いて同一である。

pING2006EおよびpSV2-neoプラスミドを保持している細菌を、サンドリー・ゴールドジンら [Sandri-Goldin, R.M. et al., Mol. Cell. Biol., 1:743 (1981)] の方法によってプロトプラストに変換した。次いで、ポリエチレングリコールで処理することによって、これらのプロトプラストを別々にSP2/0-Ag14ハイブリドーマ細胞(ATGC-CR L1581)に融合させた [オチラ (Ochi, A. et al., Nature, 302:340, 1983)]。この融合細胞を完全培地中で72時間回復させ、次いで96ウェルの組織培養プレート中、ウェルあたり10,000または50,000細胞で蒔いた。この細胞を2週間、0.8mg/mlのG418で選択すると、いくつかのウェルでの増殖が明白になった。これらの選択条件下では、SP2/0細胞はG418によって4~7日以内に完全に死滅させられる。ベクター中に存在するneo遺伝子が組込まれ、それを発現した細胞だけがG418選択のもとで増殖する。これら組込みトランフェクタントによる増殖に対してポジティブなウェルの数を第2表に示す。

第 2 表 *

株/プラスミド	10,000細胞/ウェル	50,000細胞/ウェル
MC1061/pING2006E	3 (13%)	12 (50%)
MC1061/pSV2-neo	7 (29%)	4 (17%)
MC1061/なし	0	0

* 24ウェルのうちポジティブな増殖を示したウェルの割合(%)

pING2006EおよびpSV2-neoでトランスフェクションした細胞を、RNAおよびタンパク質レベルで免疫グロブリン遺伝子発現について試験した。全細胞RNAをトランスフェクションした細胞から調製し、ニトロセルロースに結合させ、そしてマウス-ヒトハイブリッド重鎖遺伝子に特異的なニック-トランスレーションしたプローブとハイブリダイズさせた。強いシグナルを有する2つのクローンが見い出され、RNAレベルで遺伝子の発現を示した。マウス-ヒトプローブとハイブリダイズする全細胞性RNAの量は、もとのハイブリドーマ細胞中の重鎖RNAの※50

※レベルの約1/10のようであった。これはおそらくトランスフェクションされた細胞の全mRNAの約1%を示すであろう。

また、トランスフェクションされたマウス細胞を、ELISA検定により、細胞質ヒト重鎖タンパク質の産生について試験した。7つのpING2006Eトランスフェクションされたセルラインのうちの3つが、検出可能なレベルのヒト重鎖タンパク質を産生することがわかった。最大のマウス-ヒト重鎖タンパク質を産生するマウス細胞形質転換体は、ELISA検定において、無傷のヒト免疫グロブ

43

リンIgG1を産生するヒトBセルラインの1/100希釈のシグナルに匹敵するシグナルを与えた。この検出されたマウス-ヒト重鎖タンパク質のそれほど多くないレベルは、ハイブリドーマ細胞中における軽鎖の非存在下での重鎖の不安定性、またはキメラ遺伝子転写体の正しくないプロセッシングを含む、いくつかの因子によるものであろう。

(4) 組込まれたキメラ遺伝子の遺伝子増幅

サザンブロット分析は、pING2006E DNA配列の多数のコピーがマウスゲノム中に直列して組込まれていることを示した。制限酵素Apa IおよびBgl IIの両者はpING2006Eを1つに切断する。形質転換体2AE9において、予想される大きさ(8.2kb)のApa IまたはBgl II消化からのバンドが、ヒトC α 1配列とハイブリダイズすることがわかった(データは示していない)。正しい大きさ(1.6kb)のBamH Iバンドは、ヒトならびに1E9 V α 配列とハイブリダイズすることがわかった。遺伝子コピー滴定実験(第14図)は、2AE9ゲノム中に約5コピーのpING2006Eが存在することを示した。Apa IまたはBgl IIレーンにおいて唯1つのバンドだけが検出されるという事実は、これら個々のコピーが直列して並んでいることを示すものである。1群の2重消化は、pING2006E配列がマウスDNAへのその導入において転位を受けないことを示した(データは示していない)。

次いで、別の選択マーカーgpt遺伝子を含有するプラスミドで2AE9細胞をトランスフェクションし、DMEM-HAT中で増殖するクローンを選択した。クローンの1つ2BH10は、10⁶細胞あたり約38ngの可溶性ヒト α 1タンパク質を有している。サザン分析によって、2BH10が約30コピーのpING2006Eを有していることが示された(第14図)。これらは、DNA配列が転位することなく2AE9において5コピーから増幅された(2AE9の粹を2BH10のものと比較)。S1のデータ(示していない)は、この鎖型の増加がさらに多量のIgG遺伝子転写体に導くことを示した。これらの配列第2の選択の結果として隣接の細胞性配列とともに同時増幅されたものと考えられる。

実施例3: 癌抗原特異性を有するヒト-マウスキメラ抗体

(1) 抗体L6

L6モノクローナル抗体(MAb)は、ヒト肺癌由来細胞でマウスを免疫した後、その脾細胞をNS-1マウス骨髓腫細胞で交雑することにより得られた。その抗体は、肺癌(腺、扁平)、乳癌、結腸癌、卵巣癌を含めて、殆どどのヒト癌由来の細胞表面で大量に発現するが、成人宿主由来の正常細胞には微量にしか存在しない未同定の炭水化物抗原に結合する。MAb L6はIgG2aであり、抗体依存性細胞障害ADCCをエフェクター細胞の材料としてのヒト末梢白血球の存在下で惹起させることができ、また、補体の材料としてのヒト血清の存在下でL6陽性腫瘍細胞を溶解することができる。溶解は4時間のインキュベーションの間における標識細胞からの⁵¹Crの放出とし

44

て検出される。MAb L6はヌードマウスに異種移植したL6陽性腫瘍に局在することができ、そして、そのような腫瘍の成長を阻害することができる。

MAb L6はCancer Res. 46:3917-3923, 1986 (MAbの特異性について)及びProc. Natl. Acad. Sci. 83:7059-7063, 1986 (MAbの機能について)において記述されている。

(2) L6の免疫グロブリンmRNAにおけるJ配列の同定

凍結細胞を110分間氷上で、次いで室温に溶解した。懸濁液を15mM PBSで希釈し、細胞を遠心分離して沈下させた。PBSで洗浄後、16mMの3M LiCl, 6M尿素で再度懸濁し、ポリトロンシェア(polytron shear)で粉砕した。mRNAの調製及びポリ(A⁺)フラクションの選択はAuffray, C. and Rougein, F., Eur. J. Biochem. 107:303, 1980に記載の方法により行った。

L6由来のポリ(A⁺)RNAをNobrega et al. Anal. Biochem. 131:141, 1983に記載の条件下で、ラベルしたJH1、JH2、JH3及びJH4オリゴヌクレオチドで個別にハイブリダイズした。生成物を次いで、1.7%アガロース-TBEゲルで電気泳動を行った。ゲルは10%TCAで固定し、ブロットし、放射線写真のための露光を行った。その結果、L6 V α がJH2配列を含有することが示された。

VK mRNAの分析には、White and Bancroft J. Biol. Chem. 257:8569, (1982)のドットブロット法(dot-blot method)を用いた。ポリ(A⁺)RNAをニトロセルロースフィルター上で固定し、4×SSC中、40°Cでラベルしたプローブオリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせた。これらの実験により、L6はJK5配列を含有することが示される。JK2に対する僅かなハイブリタイゼーションがみられた。

(3) V領域のcDNAクローン

L6ポリ(A⁺)RNA上でオリゴ(dT)によりプライムされたライブラリーを、マウスCK領域のプローブを有するカップクローンを得る目的でスクリーニングした。L6ライブラリーから、いくつかのクローンを分離した。5' JK5特異的プローブを用いてこの二度目のスクリーニングでL6 (JK5) 軽鎖クローンを同定した。L6の重鎖クローンは、JH2オリゴヌクレオチドを用いてスクリーニングし分離した。

cDNAクローンからの重鎖及び軽鎖の遺伝子又は遺伝子断片、pH3-6a及びpL3-12aをヌクレオチド配列の解析のためにM13バクテリオファージベクターに挿入した。これらのクローンの可変領域の完全ヌクレオチド配列をジデオキシチンターミネーション法により(第15図、第16図)決定した。これらの配列により測定した組成とよく一致したV領域のアミノ酸組成が予測され、また、V領域部分のアミノ酸の直接シーケンスにより確認されたペプチド配列が予測される。

cDNAクローンのヌクレオチド配列から、それからVDメインを鑑別するアミノ酸残基を含むもので、免疫グロブリンV領域クローンであることが示される(Kabat et

45

al., Sequences of Proteins of Immunological Interest; U.S. Dept of HHS, 1983)。

L6 VHはサブグループIIに属する。そのcDNAにより、24のアミノ酸残基のN末端配列が既知のVH配列と一致していることが予測される(45-165CRI; Margolies et al., Mol. Immunol. 18:1065, 1981)。L6 VHはJH2配列を有する。L6 VLはVK-Kpn Iファミリー(Nishi et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:6399, 1985)に由来し、JK5を用いる。クローンされたL6 VLにより、18-40, 80-96残基に対応するL6軽鎖由来ペプチドのアミノ酸シーケンスにより確認されたアミノ酸配列が予測される。

(4) ヒトC-モジュール(C-Module)に結合するJ領域中の制限酵素部位を操作し及びVモジュール(V Modules)へのオリゴ(dc)配列5'を除去する、in vitroでの突然変異誘発性オリゴ(dT) L6 VK及びL6 VHでのプライミングにより生じた両クローンは修飾の必要がある。L6 VK'には、J領域突然変異誘発プライマーJK

Hind IIIを第17B図に示す如く、用いた。cDNAクローン由来のヒトCKモジュールは、Hind III配列を含むように突然変異誘発を行った(第17A図参照)。突然変異誘発反応は、これらの遺伝子のM13サブクローンについて実施した。突然変異クローンの生じる頻度は得られたブラークの0.5から1%に分布した。

VHキメラ遺伝子中のAUSコドン上流のオリゴ(dc)配列は、1つの特定の遺伝子構築中における適切なスプライシングにより干渉されることが、以前から観察されている。RNA転写物の約70%がミススプライシングを受け、そして、リーダー配列中の隠れた3'スプライスアクセプターが働いたものと判断された。それ故に、イニシエーター-AUSの上流のオリゴ(dc)配列をクローンの全てにおいて除去した。

1つの方法として、L6 VKクローンを突然変異させるSal I制限酵素部位を含むオリゴヌクレオチドを用いた。このオリゴヌクレオチドによる突然変異誘発に用いたプライマーは、オリゴ(dc)とイニシエーターのmetコードの間へSal I部位を挿入する22-merである(第19図)。

別の方法として、ヌクレアーゼBAL-31をL6 VHクローン pH3-6a中のオリゴ(dc)を切断するのに用いた。得られた突然変異体のうち2つについて、削除したサイズをヌクレオチドシーケンシングにより決定した。第17図に示す。これらの突然変異体(デルタ4及びデルタ21)の双方とも、コーディング領域へのオリゴ(dc)5'の全てを削除した。

これらのクローンを次いで、MJH-2Apa Iプライマーを用いたオリゴヌクレオチドによる突然変異誘発により修飾した(第17図)。この31塩基プライマーを、ヒトC gamma1 cDNA遺伝子モジュール中に存在するApa I部位に類似した位置にあるマウスCH遺伝子中のApa I部位を挿入する。そのプライマーはヒトC gamma1遺伝子に適

46

当なコドン挿入する。突然変異誘発させたマウスVH遺伝子をモジュールをヒトCHモジュールに結合させることにより得られたキメラ重鎖遺伝子は、VHの全領域にヒトのアミノ酸を含まないキメラ蛋白をコードしている。

ヒトC gamma1遺伝子モジュールは、GM2146細胞由来のcDNAである(Human Genetic Mutant Cell Repository, New Jersey)。このC gamma1遺伝子モジュールは、キメラ発現プラスミドpING2012Eを構築するために、マウスVH遺伝子モジュールであらかじめ結合されていた。

(5) L6キメラ発現プラスミド

L6キメラ重鎖発現プラスミドは、発現プラスミドpING2111及びpING2112を取得するために、VHモジュールpING2012Eを突然変異体デルタ21及びデルタ4のVHモジュールで置換したものに由来した(第17図)。これらのプラスミドは哺乳動物細胞にトランスフェクトされる場合に、キメラL6重鎖の合成を命令する。

L6軽鎖キメラ遺伝子については、マウスVKモジュールのSal IからHind IIIの断片を第18図に概略した手順でヒトCKモジュールに結合してpING2119を構築した。PSV2-gpt由来のE. coli gpt遺伝子を用いた新しい配列の置換により、L6キメラ軽鎖を発現し、哺乳動物細胞にトランスフェクトされた場合にミコフェノール酸耐性を与えるpING2120を得た。

同一プラスミド中に重鎖及び軽鎖キメラ遺伝子の両方を含ませることにより、重鎖と軽鎖遺伝子が1:1の比率でトランスフェクトされた細胞に導入してバランスのとれた遺伝子量(gene dosage)にすることができる。このことにより、発現が改善され、最適なキメラ抗体発現のためのトランスフェクトされた細胞の操作を減ずることができよう。この目的で、pING2111及びpING2119のキメラ重鎖、軽鎖遺伝子由来のDNA断片を発現プラスミドpING2114に結合させた(第19図)。この発現プラスミドは選択可能なneoRマーカー及び各々がマウス重鎖のエンハンサーを含んだ各キメラ遺伝子に対する分離した点差ユニットを含有している。修飾及びL6キメラ遺伝子のV-C結合領域は第20図に要約している。

(6) キメラ抗体産生用のマウス・リンパ様細胞の安定なトランスフェクション

L6キメラ発現プラスミドDNAのマウスSp2/0細胞への導入は、エレクトロポレーションを用いた(Potter et al. 上記; Toneguzzo et al. Mol. Cell Biol. 6:703; 1986)。エレグトロポレーション法によりSp2/0細胞に対して、 $1-10 \times 10^{-5}$ のトランスフェクション頻度が得られた。2つの遺伝子発現プラスミドpING2114は、Aat II制限エンドヌクレアーゼで消化することにより直線化し、Sp2/0細胞にトランスフェクトして、ヒト重鎖、軽鎖合成用にスクリーニングされる約50のG418耐性クローンを得た。2つのプロデューサーD7及び3E3から産生されたキメラ抗体の合成量は表3に示す。キメラL6抗体はD7

トランスフェクト細胞を24時間、HEPES緩衝液、ペニシリン、ストレプトマイシンを付加した5 ml DMEM中 2×10^6 細胞/ml で培養して調製した。上清を10mMリン酸ナトリウム緩衝液中、pH8.0、アミコンYM30膜で濃縮した。調製物をDEAE-セルロースカラムにかけて、免疫グロブリンを非結合と結合の分画に分離した。DEAE-非結合、DEAE-結合のサンプル及びpre-DEAE調製物（媒質1.6 ml から）を、プロテイン-Aセファロスカラムでアフィニティクロマトグラフィーにかけ、0.1Mクエン酸ナトリウムpH3.5で溶出して、個別に精製した。溶出した抗体を中和し、リン酸緩衝液生理食塩水中でアミコンセントリコン濾過（Amicon cetricon filtration）により濃縮した。3つの調製物の収量は12 µg（DEAE非結合）、6 µg（DEAE結合）、そして9 µg（pre-DEAEカラム）であった。抗体鎖のウェスタン分析により、天然の免疫グロブリンのようにH₂L₂テトラマー中で結合していることが示された。

（7）組織培地中に分泌されたキメラL6抗体の2度目の精製

- a. Sp2/O.pING2114.107細胞を、10%ウシ胎仔血清（Byclone #A-1111-D）、10mM HEPES、1X Glutamine-Pen-Strep（Irvine Scientific #9316）を補充した培地中（DMEM（Gibco #320-1965））で 1×10^6 細胞/ml になるまで成長させた。
- b. 次いで、細胞を400xgで遠心分離し、 2×10^6 細胞/ml で10-24時間、無血清培地中で再懸濁した。
- c. 培地をJS-4.2ローター（3000xg）中で、15分間、4000PRMで遠心分離した。
- d. 上清1.6 ml を次いで0.45ミクロンフィルターで濾過し、YM30（Amicon Corp.）フィルターで25 ml に濃縮した。
- e. 濃縮した上清のコンダクタンスを5.7-5.6ms/cm に調整し、pHを8.0に調整した。
- f. 上清を2000xg、5分間、遠心分離し、次いで、10 mMリン酸ナトリウムpH8.0で予め平衡化した400 ml DEAE

Bカラムにかけた。

g. フラクションへの流出物を収集し、10mMリン酸ナトリウムpH8.0で予め平衡化した1 ml プロテイン-A-セファロース（Sigma）にかけた。

h. カラムをまず10mMリン酸ナトリウム緩衝液pH8.0 6 ml で洗浄、次に0.1Mクエン酸ナトリウムpH3.5 8 ml で洗浄、次で0.1Mクエン酸（pH2.2）6 ml を用いて洗浄した。0.5 ml のフラクションを2Mトリス塩基（Sigma）50 µl を含有するチューブ中に収集した。

i. IgGの大部分はpH3.5溶出液中にあり、プール後、セントリコン30（Amicon Corp.）により約0.06 ml に濃縮した。

j. PBSを用いての希釈と再濃縮を繰返すことによりセントリコン30中で、緩衝液をPBS（10mMリン酸ナトリウムpH7.4、0.15M NaCl）に変更した。

k. IgG溶液を次いで0.10 ml に調整し、ウシ血清アルブミン（Fraction V, U.S. Biochemicals）を安定剤として1.0%添加した。

（8）腹水中に分泌されたキメラL6抗体の産生と精製

- a. 腹水をまず2000xg、10分間遠心分離した。
- b. 上清のコンダクタンスを5.7-5.6ms/cm調整し、そのpH8.0に調整した。
- c. 上清を次いで10mM Na₂PO₄H pHを8.0で予め平衡化した40 ml のDEAE-セルロースカラムにかけた。
- d. DEAEカラムからの流出物を収集し、pHを7.4に調整し、次いで1.0 ml のヤギ抗ヒトIgG（H+L）-セファロースカラムにかけた。
- e. カラムをまず6 ml の10mMリン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウムで洗浄し、更に8 ml の0.5M NH₄OH、3Mチオシアン化ナトリウムで洗浄した。
- f. チオシアン化ナトリウム溶出液をプールし、2L PBSに対して一夜透析した。

抗体は前述の手順のj及びk工程により、更に濃縮することができる。

表 3

Sp2/OトランスフェクタントからのL6キメラ鎖の分泌量

培養条件	FBS	Sp2/O. D7		Sp2/O. 3E3	
		γH ^a ^b	γマ ^c	γH ^a ^b	γマ ^c
1. 20mQ, 2d, シート @ 2×10 ⁵ /mQ	+	17	77	100	700
2. 200mQ, 2d シート @ 2.5×10 ⁵ /mQ	+	0.9	6	80	215
3. 200mQ, 1d シート @ 2×10 ⁵ /mQ	-	1.9	3.8	97	221
4. Balb/c 腹水	-	5,160	19,170	ND	ND

a. -pING2114 (pL6HL) でエレクトロポレーションによりトランスフェクトされたSp2/O細胞

b. -ヒトカッパーヒトBence-Jones蛋白標準に対して特異性のあるELISAによって測定されたμg/ℓ

c. -ヒトガンマー-ヒトIgG標準に対して特異性のあるELISAにより測定されたμg/ℓND - 測定されず

FBS: ウシ胎仔血清

(9) キメラL6抗体について実施した試験

L6抗原陽性及びL6抗原陰性のセルライン双方の細胞をスタンダードマウスモノクローナル抗体L6、細胞培養の上清由来のキメラL6抗体及び腹水由来のキメラL6抗体(前述の通り)とともにインキュベートし、次いで第二試薬としてフルオレスセイン-イソチオシアネート (FITC) と結合した、ヒト (又はスタンダードとしてマウス) 免疫グロブリンに対するヤギ抗体を用いて、まずサンプルをバインディングアッセイにより検査した。

バインディングアッセイにより、キメラL6はL6抗原陽性セルラインに対して強い反応を示し、陰性セルラインには全く反応を示さなかったため、次の段階は、マウス*50

*L6の抗原陽性細胞に対する結合をキメラL6が阻害する能力を検査した。このような阻害アッセイは2つの抗体の抗原認識を同定するのに日常的に用いられている。これらのデータは以下(“バインディングの阻害”)で述べる。これらの試験の一部として、抗体結合性の大きさは評価を行った。

最後に、抗体機能の2つの面、ヒト末梢白血球存在下におけるADCC介在能と補体の材料としてのヒト血清存在下におけるL6陽性腫瘍細胞破壊能を検討した(以下の“機能的アッセイ”を参照)。

バインディングアッセイL6抗原約5×10⁶分子を細胞表面で発現することが既に知られている、ヒト結腸癌ラ

イン、3347由来細胞を標的として用いた。Tセルライン HSB2由来細胞は、以前の試験によるとL6抗原の検出可能な量を発現しないので、ネガティブコントロールとして用いた。標的細胞はまずキメラL6又はマウス腹水から精製したマウスL6スタンダードのいずれかで30分間、4℃でインキュベートした。更に、TAGO (Burlingame, (C A) から取得した、キメラ抗体に対してヤギ抗ヒト免疫グロブリンであるラベルされたFITCを第二試薬としてインキュベーションし、希釈は1:50で行った。マウススタンダードとしては、TAGOから取得したヤギ抗マウス免疫グロブリンを1:50の割合で希釈した。細胞表面に結合する抗体はコールターモデル (Coulter Model) EPIC-C細胞ソーターを用いて検出した。

表4及び表4Aに示すように、キメラ及びマウススタンダードL6は、L6陽性3347ラインに対し、ほぼ同程度に有意に結合した。L6陰性HSB2ラインに対しては、上記の経緯にあるように結合しなかった。

表4に示した3つの異なるキメラL6サンプルがバインディングアッセイで同様の挙動を示した事実から、以下に示す阻害試験を行うためにそれらをプールした。同一の阻害試験を表4Aに示す腹水由来のキメラL6について実施した。

バインディングの阻害 次の段階として、キメラL6抗体又はスタンダードマウスL6のどの程度の量が3347結腸癌細胞陽性抗原の表面に対するFITCでラベルされたマウスL6のバインディングを阻害することができるかについて試験を実施した。

キメラ及びマウススタンダードL6は共に、直接ラベルしたL6抗体のバインディングを阻害し、バインディング曲線は平行となった。バインディングの50%阻害のために、スタンダードマウスL6MAbが2.0 μ g/ml必要であるのに対し、プールしたキメラL6 MAbでは3.4 μ g/mlが必要であったこと、及びバインディングの50%阻害のために、スタンダードマウスL6 MAbで2.7 μ g/ml必要であるのに対し、キメラL6 (腹水由来) は5.5 μ g/ml必要であったという結果が示すように、キメラ抗体はスタンダードよりもやや効力が弱かった。

これらの試験の一部として、抗体結合性の大きさばな評価を行った。スタンダードマウスL6の結合性は約4 $\times 10^8$ と以前から測定されていた。データによりキメラとマウスL6間に結合性の有意な差はないことが示された。機能的アッセイ キメラL6及びスタンダードマウスL6について、エフェクター細胞の材料としてのヒト末梢白血球 (抗体依存性細胞障害、ADCCを介する)、又は補体の材料としてのヒト血清 (補体依存性細胞溶解CDCを介する) の存在下で、L6抗原陽性細胞に対する溶解能の比較を行った。

表5及び表5A~Dに示すように、キメラL6は同時に試験したマウスL6サンプルよりも、4時間の⁵¹Cr放出試験により測定したADCCの惹起について優れていた。

表6及び表6A~6Bは補体が介在した標的細胞溶解についての試験データを示す。この場合には、マウス及びキメラL6抗体共に、高い細胞溶解活性がみられた。

結論

上記した結果は、本発明のキメラL6モノクローナル抗体について多くの重要な予期せぬ性質を示している。まず、キメラL6抗体はL6抗原陽性腫瘍細胞に対して、マウスL6スタンダードとほぼ同程度に結合しほぼ同程度に結合性を有している。

このことは、以下の理由により重要である。L6抗体は、(a) 表面炭水化物抗原及び(b) 約20,000ダントンのタンパク質抗原を特定しており、それらは非小細胞肺癌 (NSCLC)、その他のある種のヒト癌の特性である。重要なこととして、L6抗体は、線維芽細胞、内皮細胞、又は主要器官の上皮細胞のような正常細胞に対しては検出可能な結合はしない。このように、キメラL6モノクローナル抗体は、癌細胞に対しては特異的であって、正常細胞に対しては特異的でない抗原を特定する。

本発明のキメラL6モノクローナル抗体が悪性細胞に対して特異的に結合し、腫瘍を位置決めする能力を有するに加えて、キメラL6は標的への結合に基づき、腫瘍の免疫療法に対して主要な候補となるような重要な生物学的効果を発揮する。ここで示した結果により、キメラL6は腫瘍細胞に結合することができ、この結合に基づき腫瘍細胞をADCC又はCDCのいずれかにより破壊することが証明される。そのような腫瘍破壊活性は、キメラL6抗体の0.01 μ g/ml (10ng/ml) という低濃度で示された。

モノクローナル抗体を用いての腫瘍治療を試みる見込みは魅力的であり、部分的な腫瘍の縮小についていくつかの報告がなされているものの、今日までモノクローナル抗体療法の成功は限られたものであった (Houghton, F ebruarg 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 1242-1246)。

マウスモノクローナル抗体の治療効果 (これまでに試験されてきたもの) は、大概の実用目的としては低すぎるようである。癌抗原に対する特異性を備えたキメラL6の重要な生物学的活性の発見により、キメラL6抗体はin vivoでの腫瘍の治療において選択される治療剤となる。さらに、キメラL6モノクローナル抗体がin vivoでのクリアランスをより抵抗させる「ヒト」の特性を持つことから、キメラL6モノクローナル抗体は、非修飾キメラ抗体での治療のみならず、適当にラベルしたキメラL6抗体を用いた腫瘍のin vivoでのイメージングのような診断目的と同様、薬剤、毒素、免疫調節剤、アイソトープなどの種々の免疫複合体の開発にとって有益に用いられるであろう。そのような免疫複合体は当業者者に知られており、本発明のキメラL6抗体分子を修飾するのに用いることができる。

キメラL6抗体を分泌するセルラインの2例が本出願の出願日前に、Rockville MarylandにあるADCCに寄託された。これらはトランスフェクトされたハイブリドーマ

C255 (上記の3E3細胞に対応)、ATCC HB9240とトランスフェクトされたハイブリドーマC256 (上記のC7細胞)、ATCC HB9251である。

*意図されたものであり、機能的に均等な全てのセルラインは発明の範囲内にあるので、本発明は寄託したセルラインにより範囲が限定されるもの

寄託した実例は、発明の1つの面の単一の例示として*

表 4

L6 抗原陽性セルライン及びL6 抗原陰性セルラインにおけるキメラL6 抗体及びマウスL6 モノクローナル抗体のバインディングアッセイ

H3347細胞 (L6+)			
に対する結合率*			
抗体	バッチ	G A M	G A H
スタンダード L 6		50.6	4.2
キメラ L 6	a	1.3	110.3
	b	1.3	110.3
	c	1.3	110.3
HSB-2細胞 (L6-)			
に対する結合率*			
		G A M	G A H
スタンダード L 6		1.1	1.1
キメラ L 6	a	1.0	1.0
	b	1.0	1.1
	c	1.0	1.1

* 全てのアッセイは濃度 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体を用いて行った。結合率は G A M (F I T C コンジュゲート ヤギ抗マウス) もしくは G A H (F I T C コンジュゲート ヤギ抗ヒト) のみで処理した対照サンプルに比して、テストサンプルが何倍の明るさであるかで示す。結合率 1 は、テストサンプルが対照とちょうど同じ明るさであることを意味し、結合率 2 はテストサンプルが対照の 2 倍の明るさであることを意味する。

表 4 A

L6抗原陽性セルライン及びL6抗原陰性セルラインにおけるキメラL6抗体及びマウスモノクローナル抗体のバインディングアッセイ

抗体	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H3347細胞(L6+) に対する結合率*	
		GAM	GAH
スタンダードL6	30	38	4
	10	49	4
	3	40	3
キメラL6 (腹水)	30	2	108
	10	2	108
	3	1	42
キメラL6 (細胞培養)	30	1	105
	10	1	86
	3	1	44
		HSB-2細胞(L6-) に対する結合率*	
		GAH	GAM
スタンダードL6	10	1	1
キメラL6(腹水)	10	1	1
キメラL6 (細胞培養)	10	1	1

* 結合率は、GAM(FITCコンジュゲート抗ヒト)のみで処理した対照サンプルに比して、テストサンプルが何倍の明るさであるかで示す。結合率1はテストサンプルが対照とちょうど同じ明るさであることを意味し、結合率2はテストサンプルが対照の2倍の明るさであることを意味する。

表5

結腸癌セルライン3347におけるキメラL6(マウス)L6抗体
のADCC

抗体	抗体濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	標的細胞に 対するPBL の割合	% 細胞溶解*
キメラL6	10	100	64
	5	100	70
	10	0	2
スタンダードL6	10	100	24
	5	100	17
	10	0	2
なし	0	100	1

* 標的細胞を ^{51}Cr でラベルし、MAb及びヒト末梢血白血球(PBL)の配合物に4時間さらし、次いで ^{51}Cr の放出を測定した。
 ^{51}Cr の放出(未処理の細胞からの自然放出値の補正をした後)
は、細胞溶解のパーセントの尺度である。

表 5 A

結腸癌セルライン3347におけるキメラL6及びスタンダード
(マウス)L6抗体のADCC

抗体	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	標的細胞に 対するPBL の割合	% 細胞溶解*
キメラL6	20	100	80
(腹水)	10	100	74
	5	100	71
	2.5	100	71
	20	0	0
キメラL6	10	100	84
(細胞培養)	5	100	74
	2.5	100	67
	10	0	3
スタンダードL6	20	100	32
	10	100	26
	20	0	0

* 標的細胞を ^{51}Cr でラベルし、MAb及びヒト末梢血白血球(PBL)の配合物に4時間さらし、次いで ^{51}Cr の放出を測定した。
 ^{51}Cr の放出(未処理の細胞からの自然放出値の補正をした後)
は、細胞溶解のパーセントの尺度である。

表5B

結腸癌セルライン3347におけるキメラL6及びスタンダード
(マウス)L6抗体のADCC

抗体	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	標的細胞に 対するPBL の割合	% 細胞溶解*
キメラL6 (腹水)	5	100	84
	2.5	100	78
	1.25	100	85
	0.63	100	81
	0.31	100	80
	0.16	100	71
	0.08	100	65
	5	0	0
スタンダードL6	5	100	32
	5	0	0
なし	0	100	19

* 標的細胞を ^{51}Cr でラベルし、MAb及びヒト末梢血白血球(PBL)の配合物に4時間さらし、次いで ^{51}Cr の放出を測定した。
 ^{51}Cr の放出(未処理の細胞からの自然放出値の補正をした後)
は、細胞溶解のパーセントの尺度である。

表5C

肺癌セルラインH2669におけるキメラL6及びスタンダード
(マウス)L6抗体のADCC

抗体	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	標的細胞に 対するPBL の割合	% 細胞溶解*
キメラL6	10	100	35
(腹水)	1	100	31
	0.1	100	27
	0.01	100	15
	0.001	100	13
	0.0001	0	15
スタンダードL6	10	100	9
	1	100	15
なし	0	100	9
キメラL6	10	10	19
(腹水)	1	10	15
	0.1	10	11
	0.01	10	13
	0.001	10	22
	0.0001	10	11
スタンダードL6	10	10	7
	1	10	6
なし	0	10	8

表5C(続き)

肺癌セルラインH2669におけるキメラL6及びスタンダード
(マウス)L6抗体のADCC

抗体	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	標的細胞に 対するPBL の割合	% 細胞溶解*
キメラL6 (腹水)	10	0	4
スタンダードL6	10	0	9

- * 標的細胞を ^{51}Cr でラベルし、MAb及びヒト末梢血白血球(PBL)の配合物に4時間さらし、次いで ^{51}Cr の放出を測定した。
 ^{51}Cr の放出(未処理の細胞からの自然放出値の補正をした後)
は、細胞溶解のパーセントの尺度である。

表5D

結腸癌セルライン3347におけるキメラL6及びスタンダード
(マウス)L6抗体のADCC

抗体	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	標的細胞に 対するPBL の割合	% 細胞溶解*
キメラL6 (腹水)	10	100	62
	1	100	66
	0.1	100	69
	0.01	100	26
	0.001	100	8
	0.0001	0	3
	10	0	0
スタンダードL6	10	100	19
	1	100	24
		0	0
なし	0	100	8

* 標的細胞を ^{51}Cr でラベルし、MAb及びヒト末梢血白血球(PBL)の配合物に4時間さらし、 ^{51}Cr の放出(未処理の細胞からの自然放出値の補正をした後)は、細胞溶解のパーセントの尺度である。

表6

ライン3347由来の結腸癌細胞における、4時間の ^{51}Cr 放出
アッセイにより測定したキメラ及びスタンダード(マウス)L6の補
体依存性細胞毒性効果

健常者からのヒト血清を補体の材料として用いた。

抗体	ヒト補体	%細胞 溶解
L6スタンダード $10\mu\text{g}/\text{ml}$	あり	90
L6キメラ $10\mu\text{g}/\text{ml}$	あり	89
L6スタンダード $10\mu\text{g}/\text{ml}$	なし	0
L6キメラ $10\mu\text{g}/\text{ml}$	なし	1

表 6 A

結腸癌セルライン3347におけるキメラL6及びスタンダード
(マウス)L6抗体の補体依存性細胞毒性効果

抗体	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	標的細胞に 対するPBL の割合	% 細胞溶解*
キメラL6 (腹水)	20	+	29
	10	+	23
	5	+	18
	2.5	+	8
	20	不活化	0
キメラL6 (細胞培養)	10	0	0
	20	+	29
	5	+	26
	2.5	+	18
	20	+	4
スタンダードL6	10	0	4
	20	+	55
	10	+	37
	20	不活化	0
	20	0	1
なし	0	+	0

* 補体の介在による細胞溶解を4時間の ^{51}Cr 放出アッセイによって測定した。健常者からのヒト血清を補体の材料として用いた。

表6B

結腸癌セルライン3347におけるキメラL6及びスタンダード
(マウス)L6抗体の補体依存性細胞毒性効果

抗体	抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	標的細胞に 対するPBL の割合,	% 細胞溶解*
キメラL6 (腹水)	10	+	209
	5	+	155
	2.5	+	166
	1.25	+	114
	0.6	+	63
	0.3	+	17
	10	0	0
スタンダードL6	10	+	96
	5	+	83
	2.5	+	48
	1.25	+	18
	0.6	+	7
	0.3	+	4
	10	0	2
なし	0	+	0

* 補体の介在による細胞溶解を4時間の ^{51}Cr 放出アッセイによって測定した。健常者からのヒト血清を補体の材料として用いた。

実施例4: ヒトB-セル抗原に特異性を有するヒトマウスキメラ抗体

2H7マウスモノクローナル抗体(ガンマ2bK)はヒトB-セル表面抗原であるBp35を認識する(Clark, E.A. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82:1766 (1985))。Bp35分子はB-セルの活性化に重要な働きをしている。mRNAを2H7セルラインから調製した。2つのcDNAライブラリーを1つは重鎖UIG-Hプライマを用いて、また、他の一つはオリゴ(dT)を用いて得た。1つのVHクローン、pH2-11を同一のUIG-Hオリゴヌクレオチドを用いてスクリーニングし分離した。軽鎖クローンを文離するために、マウスカッパ特異的DNA断片を用いてオリゴ(dT)ライブラリーをスクリーニングした。候補のクローンは* 50

* マウスJK5配列を用いて、更にスクリーニングした。1つのVKクローン、pL2-12をこのようにして分離した。次いで、軽鎖UIG-KをJ領域中の制限酵素部位を工作するのに用いた。

2つのcDNAクローンも人工的なオリゴ(d)配列を除去するために5'端を修飾した。pH2-11では、ATG開始コドンの1つのヌクレオチド5'残基を切断する制限酵素Nco Iを用いて行った。pL2-12では、22-merコンテナー-Sal I部位を用いて、in vitroでのヌクレオチドの突然変異誘発により行った。

これらの2つのクローンDNA配列を第21, 22図に示す。キメラ重鎖プラスミドの構築には、VHモジュールをJH BatE H部位でヒトGガンマ1モジュールに結合し、そし

75

てキメラ軽鎖の構築には、VKモジュールをJK Hind III 部位でヒトCKモジュール7 (pGML60) に結合した。発現ベクターの配列はpING2016-gptと同様にpING2012-neoに由来していた。構築したプラスミドはpING2101 (VHCガンマ1-neo)、pING2106 (VK CK-neo)、pING2017 (VK CK-gpt) である。pING2101及びpING2106もまた両方の遺伝子を含むプラスミドを作るのに用いた。それらはpHL2-11及びpHL2-26である。更に、pING2106及びpING2014は、トランスフェクトされた細胞中での軽鎖タンパク質の安定した状態での蓄積が(重鎖と比較して) 乏しいことと埋め合わせるために、2つの軽鎖のプラスミドpHL2-25に結合させた(第23図参照)。第24図は構築中に可変領域の配列に対して行った変更を示す。プラスミドpHL2-11はAat IIにより長線化し、そして、そのDNAをエレクトロポレーションによってSp2/0細胞をトランスフェクトするのに用いた。形質転換体をG418-DMEMで選択した。1つの形質転換体1C9はELISAによる測定で、キメラカッパ9.3ng/ml及びキメラガンマ1タンパク33-72ng/mlを産生する。1C9DNAのサザン分析により、Sp2/0ゲノム中に統合されたプラスミドの1つのコピーが存在することが示された。

実施例5 酵母から機能的キメラの抗体の分泌

(1) マチュアークメラのL6L鎖とH鎖との遺伝子の酵母インペルターゼシグナル配列と短縮されたホスホグリセレートキメーゼ (PGKプロモーター) への融合

酵母菌体は、哺乳類の分泌シグナル配列を認識し、また哺乳類の蛋白の分泌を指揮する能力を有する(ヒツマン等、前掲)。しかし、ある種の未変性酵母シグナル配列は、酵母からいくらかの哺乳類の蛋白の分泌を指揮するのに、哺乳類のシグナル配列よりもより有効であることを示唆する証拠がある(スミス等、サイエンス229巻1219頁(1985年))。一例は酵母インペルターゼ遺伝子用のシグナル配列である。L鎖とH鎖の分泌の能力を改良するために、マチュアール鎖とH鎖の配列を、酵母インペルターゼシグナル配列に融合し、第25図と第26図にそれぞれ概要を述べている手順を用いて、短縮されたPGKプロモーター(米国特許出願第797,477号)の転写制御下に置いた。これらの構造の重要な要素は、インペルターゼシグナル配列(米国特許出願第797,477号参照)およびL鎖とH鎖との遺伝子用に、シグナル配列プロセッシング部位に制限部位を導入するためにインビトロ変位誘発用いることである。これらの制限部位は非常によく位置しているので、制限酵素消化、T-4DNAポリメラーゼ処理のDNAの平滑末端の連結反応により、マチュアールIgMグロブリン鎖の5'末端と酵素インペルターゼシグナル配列の3'末端とが相内、翻訳融合される。

このような遺伝子は、酵素細胞内に表現されると、形質導入マウスSp2/0細胞から分泌されたキメラのLおよびH鎖と同じ第一級ペプチド配列と共にキメラのLおよびH鎖の合成、プロセッシングおよび分泌を指示する。L

76

およびH鎖遺伝子用に用いられた変異誘発プライマーのDNA配列は、対応する未変異誘発配列と同様、第25B図および第26B図にそれぞれ示される。この方法を用いて、L6キメラのLおよびH鎖は、酵素インペルターゼシグナル配列と短縮されたPGKプロモーターに融合し、プラスミドpING1407-7およびpING1415(第25C図および第26C図)となる。

(2) 非酵母3'未翻訳DNAの除去

酵母中のB型肝炎表面抗原の表現についての最近の研究により、非酵母3'および5'未翻訳配列の除去が酵母中の異型の遺伝子表現の増加された水準となることが証明された(クニースキン等、ジーン46巻135頁(1986))。pING1407(第25C図)中のキメラのL6L鎖の遺伝子配列は、ポリA配列の70bpおよびポリG配列の20bpにより起こるほぼ200bpの3'未翻訳DNAを含む。二重鎖エキソヌクレアーゼBa131によるキメラのL6L鎖DNAの最初の処理によって、ポリAおよびポリGの配列と、プラスミドpING2121b(第27図)を作る3'未翻訳DNAの90bp以外の全てが除かれた。Ckのみを含むpING2121bからの制限断片がpING1419(第27図)を作るpBR32の誘導体にクローン化された。第二のBa131消化が、次にプラスミドpING1431(第27図)を作る非酵母3'未翻訳DNAの13bp以外の全てを除去するのに用いられた。pING1415(第26図)中のキメラのL6H鎖遺伝子もまた、ポリAの80bpを含む容量3'未翻訳配列を含む。3'未翻訳DNAの11bp以外の全てが、第28図に示す手順を用い、プラスミドpING1429を作って、除去された。

部位特異的インビトロ変異誘発が、低頻度で、変異誘発されている領域外のDNAの不必要な塩基対変化を導入する。このような変異が、M13中にクローン化され、部位特異的範囲誘発を受けたキメラのL6LおよびH鎖配列に現れないことを確実にするため、機能的キメラのL6L抗体を生成することがDNA配列分析により確認されたかまたは形質導入されたマウスSp2/0細胞中での表現によって証明された、配列をコードすることにより成る、インペルターゼシグナル配列および短縮されたPGKプロモーターに融合した、LおよびH鎖遺伝子を構築した。プラスミドpING1438(L鎖、第27図)およびpING1436(H鎖、第28図)はこれらの構築により作られた。

(3) PGKポリアデニル化シグナルにそれぞれ融合した、pING1439とpING1436からキメラのL6LおよびH鎖を含む酵母表現プラスミドの構築

酵母から無傷の機能的抗体分子を得るために、宿主細胞内でのLおよびH鎖蛋白の平衡合成が提案される。一方法として、異なる選択マーカーをそれぞれ含む別個の表現ベクター上にLおよびH鎖遺伝子を置いた。プラスミド上に見られる選択マーカー中の酵母株欠陥は、次いで同時にまたは連続的にこれらプラスミドと共に形質転換される。

pING1469(第27図)およびpING1436(第28図)からの

77

キメラL6LおよびH鎖遺伝子は、Bgl II-Xho IとBamH I-Xho I断片として、それぞれ、二つの異なるメディウムコピー数(約20コピー/細胞)表現ベクター(酵母イコリシヤトル)にクローン化された。これらの一つ、pING804CVSは、完全酵母2-ミクロン環、PGK転写終止とポリアデニル化シグナルおよび選択マーカーとしてleu2遺伝子を含む。他のベクター、pING1150Iは、転写の酵母オリジン、オリイ、酵母内因性2-ミクロンプラスミドからのシスに作用する配列(REP3)、PGK転写終止とポリアデニル化シグナル、および選択マーカーとしてのura3遺伝子を含む。両プラスミドもまた、アンピシリン耐性用の β -ラクタマーゼ遺伝子(bla)と細菌中での選択と増幅用のpBR322からの複製(oriB)の細菌のオリジンを含む。4つのプラスミドは、これらの構築物、すなわちpING1441--L鎖、leu2とpING1443--L鎖、ura3(第29図); pING1440--H鎖、leu2とpING1442--H鎖、ura3(第30図)から生じた。

(4) 形質転換された酵母細胞からキメラのL6抗体の分泌

酵母細胞中LおよびH鎖合成を得る試みに、二つの別の形質転換実験を行なった。pING1441とpING1443のおのおの、および別個にpING1442とpING1443の4 μ gを、SD寒天(2%グルコース、0.69%酵母-窒素塩基、2%寒天)上での増殖用の選択により、ザッカロミセルセレビスエ株BB331C(MATa, ura3, leu2)に同時変換し

78

た、Ura⁺Leu⁺形質転換体は、30°Cで2-3日のインキュベーションで出現した。ほぼ100の形質転換体をpING1440プラスpING1443として得た。わずか15の形質転換体がpING1442プラスpING1441として得られた。10個のコロニーを各プレートから、50mMコハク酸ナトリウムが補充されたpH5.5の5mL SDブロスに接種し、65時間30°Cで増殖した。細胞を遠心分離により除去し、上清を固相酵素免疫測定法(エリサ)によりL鎖とH鎖のレベルおよび分泌LおよびH鎖の結合程度を分析した。後者は、マイクロタイターウエルをコートするのにヤギ抗ヒトカッパー抗血清を、また抗カッパーコードに結合したH鎖のレベルを決定するのにペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトガンマ抗血清を用いた。これらの検定結果(第7表)は、pING1440(H鎖、leu2)プラスpING1443(L鎖、ura3)で形質転換された細胞からの培養上清は、H鎖蛋白のレベルに比べて不均衡にL鎖蛋白を高レベルに含み、組み立てられたLおよびH鎖の証拠はない(少なくともエリサにより決定されたところでは)ことを示した。一方、pING1442(H鎖、ura3)+pING1441(L鎖、leu2)で形質転換された細胞からの上清は、LおよびH鎖蛋白がより均衡のとれた製品を含み、10の分離体の8つはエリサにより決定されるようにいくつかの組み立てられたLおよびH鎖を含むことが明らかにされた。これらの分離体の二つ、No.1とNo.5はまとめられたLとH鎖の有意差のある部分を生産した。

第7表

酵母形質転換体^aによる分泌キメラのL6L6およびH鎖のレベル

プラスミド ^b	分離体No.	カップパー ^c	ガンマ ^d	カップパー/ガンマ ^e
pING1440+	1	284	39	0
pING1443	2	324	33	0
	3	473	52	0
	4	387	40	0
	5	316	34	0
	6	188	28	0
	7	381	45	0
	8	455	45	0
	9	380	26	0
	10	579	32	0
pING1441+	1	128	79	35
pING1442	2	150	30	1
	3	124	29	0
	4	185	55	5
	5	114	52	35
	6	139	23	5
	7	149	34	5
	8	245	57	12
	9	202	26	11
	10	157	19	7

a. S. セレビシア株BB331C (MATa, leu2, ura3) は、L またはH鎖でura3とleu2を伴うプラスミドでUra⁺Leu⁺に変形した。

* 50

* b. プラスミド: pING1440 = H鎖 + leu2;

pING1443 = L鎖 + ura3;

pING1442 = H鎖 + ura3;

81

pING1441=L鎖+Ieu2

c.ng/mℓ標準としてヒトベンスージョンズ蛋白でヒトカ
ッパーに特異的なエリサにより測定

d.ng/mℓ IgG標準としてヒトでヒトガンマに特異的なエ
リサにより測定

e.ng/mℓ コーティング抗体として抗ヒトカッパーとヒト
IgG標準で二次抗体として抗ヒトガンマを用いるエリサ
により測定さらに分析して、この結合がH₂L₂-サイズ蛋
白を合成によるものかどうかの測定を行った。非常に低
レベルの明らかなLおよびH鎖結合を含んでいる分離体
No.1および5同様にNo.8からの培養上清をコントリコン
30フィルター（アミコン社）による超遠心分離により濃
縮した。濃縮した上清を非還元条件下で7%ポリアクリ
ルアミドゲルに流し、ニトロセルロースに詰め、ヤギ抗
ヒトカッパー抗血清で、次いでさらにペルオキシダーゼ
標識ウサギ抗ヤギ抗血清で試験した。分離体No.8からの
濃縮上清はそうではなかったが、分離体No.1および5か
らの濃縮上清は一本の免疫反応性横じまを含み、それは
形質導入されたSp2/0細胞からの精製キメラのL6抗体と
共移動した。これらの結果は、分離体No.1と5か組み立
てられたL6キメラの抗体を合成、分泌していることを示
唆した。

（5）酵母培養上清からキメラのL6抗体の精製

酵母により分泌されたH₂L₂-size蛋白をさらに特徴づ
け、これがまとめられたL6キメラの抗体かどうかを決定
するため、十分量の酵母生産物質を精製し、種々の結合
および機能検定に付した。pING1442+1441形質転換体の
分離体No.5を、合成培地（第8表）用いた10-リットル
培養基中、30℃で58時間増殖させた。細胞は最初9リッ
トルの9個培地中で、グルコースレベルが1g/L以下に下

82

るまで増殖し、この時点で総量2.5LのB個培地を添加し
た。グルコースレベルは培養の残りの経過の間0.5g/Lに
保った。細胞を遠心分離により除去し、培養上清は、エ
リサによってLおよびH鎖蛋白を存在とHおよびL鎖の
結合を検定した。上清はほぼ250μg/LのL鎖、240μg/L
のH鎖および130μg/Lの、L鎖と結合したH鎖を含有し
た。培養上清を次にD.C.10端域以M上の限外ろ過（アミ
コン社）により濃縮し、0.45ミクロンフィルターでろ過
し、YM30フィルター（アミコン社）で250mℓに濃縮し
た。濃縮上清をKOHでpH7.4に調整し、PBS（10mMリン酸
ナトリウム、pH7.4、150mM塩化ナトリウム）で500mℓと
し、PBSで予め平衡化した1mℓ蛋白A-セファロース
（シグマ）カラムにかけた。カラムを20mℓ PBSでまず洗
い、次いで10mℓの0.1Mクエン酸ナトリウム、pH3.5で、
それから10mℓの0.1Mクエン酸、pH2.2で洗浄した。pH3.
5と2.2の溶出液をそれぞれ、1mℓの2Mトリス塩基（シグ
マ）を含む管に集めた。LおよびH鎖免疫反応性蛋白の
バルクをpH3.5の溶出液中に入れ、次いでセントリコン3
0（アミコン社）で濃縮して最終容量106μℓとした。ク
ーマシーブルー染色を用い、抗ヒトカッパー抗血清（シ
グマ）でブロックして免疫反応で検出する、非還元ポリ
アクリルアミドゲル上での、本蛋白の分析によって、蛋
白標識H₂L₂-部位150キロダルトン蛋白横じまが見られ
た。この蛋白を、A緩衝液（10mM KPO₄、pH6.8）で平衡
化したAB×5-ミクロンカラムを用いる高性能液体クロ
マトグラフィーにより、他の蛋白から分離精製した。カ
ラムに試料をのせたのち、カラムをA緩衝液で10分間
（流速1mℓ/分）洗い、0%から50%B緩衝液（250mM
KPO₄、pH6.8）で1mℓ分の速さで50分以上、直線勾配溶
出にかけた。

第8表

分泌し6キメラの抗体^aを生成するために酵母培養に用いた倍地

成分	A ^b	B ^c
1. セレロース (グルコース)	119g/l	538g/l
2. (NH ₄) ₂ SO ₄	13.9g/l	83.3g/l
3. チアミンHCl	0.011g/l	0.05g/l
4. ビオチン	0.00011g/l	0.005g/l
5. パントテン酸	0.002g/l	0.009g/l
6. イノシトール	0.194g/l	0.875g/l
7. H ₃ PO ₄	5.67mg/l	25.5mg/l
8. KH ₂ PO ₄	5.78g/l	26.0g/l
9. MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.33g/l	15.2g/l
10. CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.33g/l	1.5g/l
11. FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.072g/l	0.34g/l
12. ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022g/l	0.104g/l
13. MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0039g/l	0.018g/l
14. CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0067g/l	0.031g/l
15. CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0056mg/l	0.026mg/l

a. 培養は本文に記載した通りに実施した。

b. 最初の9リットルバッチの成分

c. 2.5リットルの添加バッチの成分

蛋白のバルクを、280nmの吸収により決定した20から50分の間の一つの大きな広いピークに溶解した。第二のより小さなピークは52-56分に見られ、これは形質導入したSp2/0細胞からのキメラのL6抗体の通常の溶出地位に対応した。カラム分画のエリサ分析により、52-56分でのU.V.吸収ピークに対応する主要なH+L鎖交叉反応性ピークが見られた。クーマシーブルー染色を用い、ブ*50

*ロットして免疫反応で検出する、非還元SDSポリアクリルアミドゲル上での52-56分分画の分析によって、形質導入されたSp2/0細胞から精製されたL6キメラ抗体を共移動する本質的に純粋な蛋白が出現した。

(6) 酵母により分泌されたキメラのL6抗体についての研究

精製された、酵母から誘導された抗体を、幾つかの方

法で機能について評価した。最初に、精製抗体を、L6抗原陽性の細胞系に直接結合する能力につき検査した。次に抗体を、マウスL6抗体が抗原陽性の細胞に結合するのを阻害する能力につき検査した。最後に精製抗体を、抗体機能の二つの状況——ヒト末梢血液白血球の存在下、抗体依存性細胞媒介細胞傷害を仲介する能力およびヒト補体の存在下、L6陽性腫瘍を死滅する能力につき検査した。

直接検査決定 細胞表面上細胞当たりほぼ 5×10^5 分子のL6抗原を発現するヒト結腸癌系統、3347からの細胞を標的として用いた。T細胞系、T51を、それまでの検査によれば、検出できるだけの量のL6抗原を発現しなかった。負のコントロールとして用いた、標的細胞を、最初にSp2/0細胞から、あるいは酵母由来のキメラのL6抗体と、またはマウス腫瘍から精製されたマウスL6抗体標準と4℃で30分間インキュベートした。次いでキメラ抗体のためのFITC標識ヤギ抗ヒトイムノグロブリンと、またはマウス標準のためのFITC標識ヤギ抗ヒトイムノグロブリンとインキュベートした。了標識抗体はTAGO（バーリントン、カリフォルニア）から入手、1:50に希釈して用いた。細胞表面に結合する抗体はフローサイトメトリック細胞選別機を用いた決定した。

第9表に示されるように、哺乳類から、および酵母由来のキメラのL6抗体は、ともに、はっきりと、ほぼ同程度にL6陽性3347系統に結合した。それらは、上記の背景下では、L6陰性T51系統に結合しなかった。

結合の阻害 次の段階として、酵母キメラのL6抗体とSp2/0細胞由来のキメラのL6抗体とを、FITC標識マウスL6抗体が抗原陽性3347結腸癌細胞の表面に結合するのを阻害する能力につき試験した。

酵母由来のキメラのL6抗体もSp2/0から導かれたものも、ともに標識マウスL6抗体の結合を阻害し、結合曲線は平行であった。これらの検討結果を基にし、抗体親和性を大ざっぱに評価した。Sp2/0細胞由来のキメラのL6の親和性は以前にほぼ 4×10^8 であると決定されていた。データから、L6抗原のための酵母由来のキメラのL6抗体とSp2/0細胞キメラのL6抗体の親和性の間には有意差はなかった。

機能検定 酵母由来のキメラのL6、Sp2/0細胞由来のキメラのL6および標準マウスL6の各抗体の能力を比較し、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を中介する効果細胞の起源としてヒト末梢血液白血球の存在下にL6抗原陽性細胞を溶解させた。第10表に示されるように、酵母からのキメラのL6はSp2/0細胞由来のキメラのL6よりも少し良好であり、そしてすでに明らかにされていたように、両者は4時間クロム51遊離試験により測定されるように、ADCCを生ずる点で標準マウスL6よりも勝っていた。

10 次に酵母由来のキメラのL6、Sp2/0細胞由来のキメラのL6および標準マウスL6の各抗体のL6抗体陽性細胞溶解能力を、ヒト血清を補体の起源として用い、補体依存性細胞傷害（CDC）により比較した。この比較結果（第11表）は、Sp2/0細胞キメラのL6のおよび標準マウスL6の各抗体は高細胞溶解能力を示すが、酵母由来のL6抗体は最も高い抗体濃度でも何ら細胞溶解を生じないことを証明した。これらの結果は、予期されなかったものであったし、酵母由来の抗体が新しく独特の性質を有することを証明する。

20 (7) 結論

酵母が機能性抗体を遺伝的に巧みに分泌する工程が明らかにされた。本実施例中の酵母由来のキメラの抗体は、リンパ様（Sp2/0）細胞により生成されたキメラの抗体とほぼ同様の親和で特定の標的抗原と結合する。酵母由来の抗体も、Sp2/0由来の抗体と同様のADCC活性を示す。酵母由来の抗体は、Sp2/0細胞由来の抗体と異なり、CDC活性を示さず、このような酵母由来の抗体の新しく独特の性質を証明している。この工程は、選択された抗原を保持し、選択された一定のドメインアイソトープに結合したドメインに結合している、種々のモノクローナル抗体とキメラの抗体の生産に適用されうる。酵母中で生成された、遺伝的に処理された抗体やその誘導体は、新規な機能的性質、例えば、いかなる検出可能なCDC活性もなく、ADCCにより標的傷害を選択的に仲介する能力を示す。ここに記載した工学技術はまた、遺伝的に処理された酵母により種々の他の異型マルチマー分泌蛋白の生成にも適している。

30

第9表

L6抗原陽性でL6抗原陰性の細胞系上、酵母またはマウス
Sp2/0細胞により生成された、キメラのL6抗体の結合検定

抗体*	結合比 ^a	
	H3347細胞 (L6 ⁺)	T51細胞 (L6 ⁻)
標準マウスL6	95	1.0
Sp2/0キメラのL6	116	1.0
酵母キメラのL6	110	1.0

- a. 全抗体は10 μ gの濃度で用いた。
- b. 結合比は、FITC接合第二抗体で処理した標準標品よりも試料がより明るい度数である。ヤギ抗マウス抗体は、標準マウスL6モノクロナル抗体用第二抗体として用いた。ヤギ抗ヒト抗体は、酵母とSp2/0キメラのL6抗体用第二抗体として用いた。

第10表

結腸癌細胞系3347上、酵母又はSp2/0細胞由来のキメラ
のL6抗体と標準(マウス)L6抗体のADCC

抗体	抗体 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	%細胞溶解*
標準マウスL6	5.0	42
	1.0	48
Sp2/0キメラのL6	1.0	96
	0.1	71
	0.01	54
	0.001	37
酵母キメラのL6	1.0	114
	0.1	108
	0.01	76
	0.001	60
なし	0	23

* 標的細胞は ^{51}Cr で標識し、標的細胞当り100包MAbとヒト末梢血液白血球との結合に4時間さらし、 ^{51}Cr の遊離はその後測定した。 ^{51}Cr の遊離(未処理細胞からの自然遊離量の収集後)はパーセント細胞溶解測定である。

第11表

結腸癌細胞系3347上、酵母またはマウスSp2/0細胞によるキメラのL6抗体のヒト補体依存性細胞傷害効率

抗体	抗体 濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	補体 ^a (+又は-)	パーセント 傷害
標準マウスL6	5	+	122
	1	+	53
	5	-	1
Sp2/0キメラのL6	5	+	71
	1	+	22
	0.1	+	5
	5	-	2
酵母キメラのL6	5	+	3
	1	+	2
	0.1	+	4
	5	-	2

a. 健康患者からの血清を補体基源として用いた。

b. 補体依存性細胞傷害は4時間クロム51遊離アッセイにより測

定した。

実施例VI 酵母から機能的キメラのL6の分泌

IgGのFab蛋白は、単一L鎖分子がジスルフィド結合により、可変部とCH1（第31図）よりなる先端を切ったH鎖分子と結合してなる。このH鎖断片はFdとして知られている。Fabは種々の治療や診断の処理上有用な可能性がある。加えて、これは微生物の培養により生産される。

Fab生産の通常の方法は、無傷のIgGをパンパンで消化し（第31図参照）、次いで消化中に作られたFc断片からFabを精製する。この処理は、比較的容易で、高収量で $F \times 50$

* abが得られるが、初めに全抗体の生成と精製を行ない、次いで出現し、最後にFabの精製をするのは幾らか時間の浪費である。それだけでなく、全抗体分子の1/10...Fc蛋白（第31図）が利用されない。

遺伝子クローニングと部位特異変異誘発の技術の最近の進歩によって、より直接で簡単な、Fab分子の別の生産への接近が可能となった。この試みで、パンパン消化が起こるアミノ酸用のコドンのほぼ螺旋部位の内側で停止コドンがH鎖遺伝子に導入される。次いでFabが、H鎖とFd遺伝子との同時発現により直接生成され、各蛋白

を生成する。これら蛋白はまとめられ、細胞から分泌される。

(1) L6キメラのH鎖の螺旋部位への停止コドンの導入

停止コドンのL6キメラのH鎖の螺旋部位への導入の手順は第32A図に概略示される。螺旋部位内の停止コドンの位置と変異誘発プライマーのDNA配列は第32B図に示される。停止コドン配置は第31図中のアミノ酸226に対応する。この手順は、228アミノ酸より成る蛋白をコードし、L鎖に結合するシステインを越えて6つのアミノ酸を広げるFd遺伝子を含むプラスミドpING1402を出現した。変異誘発も停止コドンにおいて、Fdの3'末端の続く操作にすぐに用いられる特異なBcl I部位を導入した。これらは、限定するのに必要ではないが、特異アミノ酸用のコードづけ配列の添加や溶解蛋白の生成を含むFdの種々の型の修飾への処理と同様、H鎖3'未翻訳DNAの移動を含む。

(2) 酵母インペルターゼシグナル配列と短縮されたPGKプロモーターへのマチュア-Fd遺伝子の溶解

Fd遺伝子の酵母インペルターゼ配列への溶解の手順は、第33図に概略示されている。この試みには、酵母インペルターゼシグナル配列-マチュア-L6H鎖溶解(第26図)の先の構築を使用し、キメラのL6H鎖のJ部分中の特異なApaI部位を用いて、螺旋部中に停止コドンを含むpING1412からの定常部でCH1、CH2およびCH3より成るpING1415中の定常部を置換した。この操作はプラスミドpING1418を産生した。

(3) 非酵母3'未翻訳DNAの除去

Fd鎖の停止コドンでの特異なBcl I部位の導入は、全ての非酵母3'未翻訳DNAの除去に便利な方法を提供する。これは第34図に概略しめつける手順を用いてなされ、プラスミドpING1428を産生した。停止コドンは、MI3にクローンされたH鎖断片の部位特異性変異誘発により螺旋部分に導入されたので、変異誘発の間、希望しない変異が導入される可能性があった。そのような変異がないことを確実にするため、インペルターゼシグナル配列に溶解され、PGKプロモーターに短縮され、そして既知のコードづけ配列よりなるFd遺伝子が、第34図に概略示される手順を用いて構築され、プラスミドpING1444を産生した。

(4) PGKポリアデニル下シグナルに溶解されるpING1444からキメラのL6Fd遺伝子を含む酵母発現プラスミドの構築

酵母が無傷の機能的Fab分子を生成するために、細胞中でLとF鎖蛋白の両者が均衡が取れて合成されることが同時に起きなければならない。実施例Vで記載したように、一つの試みは、分離選択マーカーを含む分離シヤルトベクター上にL鎖とFd遺伝子を置き、これらのベクターを両選択マーカーが欠損した酵母菌株に形質転換する。

pING1444(第34図)からのFd遺伝子は、BamH I-Xho I断片として、酵母中の増殖用配列とPGKポリアデニル化、転写終結シグナル即ち、leu2選択用pING804CVSとura3選択用pING1150(第29、30図参照)を含んでいる。二つの倍地コピー数酵母-イー・コリシヤルトベクターにクローン化された。これらの構築からもたらされた二つのプラスミド-pING1445(ura3)とpING1446(leu2)は第35図に示される。

(5) 形質転換された酵母細胞からキメラのL6Fabの分泌

二つの分離形質転換実験が、酵母細胞中LとH鎖の両者合成を得る試みでなされた。pING1445(第35図)とpING1441(第30図)とpING1446の分離体(第35図)およびpING1442(第30図)の各4μgをSD寒天(2%グルコース、0.67%酵母窒素塩基、2%寒天)上、増殖用に選択することによりエス・セレビシア株BB331C CATa、ura3、leu2中に同時変換した。Ura⁺Leu⁺形質転換体が30℃で2-3日のインキュベーションで現れた。各プレートから5コロニーを、50mMコハク酸ナトリウムでpH5.5に調製した6mℓのSD培養物に接種し、30℃で65時間増殖した。細胞を遠心分離により除去し、エリサによりL鎖のレベルを分析した。これらの検定除去結果からpING146+pING1442形質転換体の培養上清中のL鎖レベルは、pING1445+pING形質転換体の培養上清中のレベルよりも3-6倍高いことが明らかとなった。各グループの形質転換体の培養上清は、次にセントリコン30フィルター(アミコン社)による限外濾過により濃縮され、非還元条件下、10%ポリアクリルアミドゲル上に流した。蛋白をニトロセルロース紙にブロットし、ヤギ抗ヒトカップー血清で次いでペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヤギ血清で調査した。pING1446とpING1442形質転換体からの濃縮上清は、Fab蛋白と期待される位置にかすかな交叉反応性横じまを示し、ブロットの大部分上への明らかな抗カップー交叉反応性を塗株を含んだ。比較により、pING1445+pING1441形質転換体からの培養上清は、ブロット上、相対的に少しの塗株の抗ヒトカップー交叉反応性蛋白を含有した。加えて、5試料の一つ(No.4)は、特に強い。Fab蛋白と期待される位置に移動した明確な抗カップー交叉反応性横じまを含有した。

(6) 酵母培養上清からキメラのL6Fabの精製

酵母から分泌されたFab-型抗カップー交叉反応性蛋白が、本当のL6キメラのFab蛋白であることを確かめるために、結合検定を行なうのに十分な量の精製物が必要であった。そこでpING1441+pING1445形質転換体分離No.4を、1リットルの50mMコハク酸ナトリウムでpH5.5に調製したSDブロス中で30℃で95時間増殖した。細胞を遠心分離により除去し、培養上清をエリサによりL鎖蛋白レベルを分析した。上清はほぼ130μg/L鎖蛋白を含有した。培養上清を次にアミコンYM30フィルターにより限外濾過により20mℓに濃縮した。濃縮上清を130mℓの10mMリン

95

酸カリウム、pH7.5 (緩衝液A) で洗浄し、YM30フィルターにより再濃縮して12.5mℓとした。濃縮上清を次に緩衝液Aで54mℓとし、緩衝液Aで平衡状態とした1.5mℓのS-セファローズカラムに乗せた。カラムを20mℓの緩衝液Aで洗い、緩衝液A中、0から200mMの塩化ナトリウム (全量40mℓ) の直線公配溶出に付した。カラムフラクションのエリサ分析により、塩濃度ほぼ60mM濃度に相当する、フラクション8と21の間に、大きい抗カッパー交叉反応性ピークが明らかになった。これらのフラクションを集め、アミコンYM10とコントリコン-10フィルター (アミコン社) で51μℓに濃縮した。非還元下および還元下のポリアクリルアミドゲル上、クーマシーブルー染色と抗ヒトカッパーと抗ヒトFab抗血清での西部ブロッティングを用いて分析した。これらの分析により非還元ゲル上は46Kdに移動した本質的に純粋な蛋白が明らかにされた。それは還元ゲル上は23と24.5Kdに走る二つの横じまに分解し、これは、それぞれL鎖とFd蛋白として予定された (アミノ酸配列を基礎として) 分子量に相当する。二つの横じまの小さい方は、西部プロット上抗ヒトカッパー抗血清に強く反応した。両蛋白横じまは、西部プロット上抗ヒトFab抗血清と反応した。

(7) 酵母により分泌されたキメラのL6Fabについてなされた検討

Fab分子の一次活性は標的抗原への結合能力である。酵母由来のキメラのFabは、それゆえ、L6抗原陽性細胞系への直接結合能力と、マウスL6抗体の抗原陽性細胞への結合の阻害能力について試験した。

直接結合検定 細胞表面上にL6抗原を含むヒト結腸癌細胞系3347からの細胞を標的として用いた。抗原陰性細胞系T50からの細胞をネガティブコントロールとして用い

96

た。標的細胞を、最初に、酵母由来のキメラのL6Fab、Sp2/0細胞由来のキメラのL6抗体と、またはマウスL6抗体と、4℃で30分間インキュベートした。次いでキメラのFab用FITC標識ヤギ抗ヒトカッパーイムノグロブリン、キメラの抗体用FITC標識ヤギ抗ヒトIgCと、又はマウス抗体用FITC標識ヤギ抗マウスイムノグロブリンとインキュベーションを行なった。再標識抗体はタグ (バーリンゲイム、カリフォルニア) から入手し、1:5希釈で用いた。細胞表面に結合する抗体はコールタモールEFIC-C細胞分選機を用いた決定した。

第12表に示されるように、酵母由来のキメラのL6FabはL6陽性3347系に結合した。酵母由来のキメラのL6Fabは上記の景色下でL6陰性T51と結合しなかった。

結合の阻害 次の段階で、我々は酵母由来のキメラのL6Fab又はSp2/0細胞由来のキメラのL6抗体のどの等級別量までFITC標識マウスL6抗体が抗原陽性結腸癌3347細胞表面に結合するのを阻害するかを検討した。

酵母由来のキメラのL6Fabの濃度は、直接標識マウスL6抗体の結合を阻害した。しかし、酵母L6は、マウスL6抗体の標的細胞への結合を50%阻害するには、Sp2/0細胞由来のキメラのL6抗体による結合阻害の程度に要求されるよりも高濃度を必要とした。

(8) 結論

酵母が遺伝的にイムノグロブリンの機能的Fabドメインを分泌せうする方法が明らかになった。本実施例において、酵母由来のキメラのFabは適当な標的抗原に結合する。そのようなFab分子は、種々の診断や治療用の便利な標的試薬に供される。この工程はまた、酵母から不均質な異種二重体分子の分泌の可能性を証明している。

30

第12表

L6抗原陽性とL6抗原陰性の細胞系での酵母により生成された
キメラのL6FABの結合検定

抗体 ^a	結合比 ^b	
	3347細胞 (L6 ⁺)	T51細胞 (L6 ⁻)
Sp2/0キメラのL6	103	1
酵母キメラのL6Fab	32	1

a: 全抗体は10 μ g/ml濃度で用いられた。

b: 結合比は、FITC-接合二次抗体で処理したコントロールよりも試料がより明るい度数である。ヤギ抗ヒト抗体はSp2/0キメラのL6抗体用二次抗体として用いられ、ヤギ抗ヒトカッパー抗体は酵母Fab用二次抗体として用いられた。

実施例7

細菌からの機能性キメラFab分子の分泌。

細菌類は、全暗号化配列が十分に特定されたプロモーターにより発現可能なため、ほ乳類cDNAから発現されるキメラ抗体の生産に適している。エシェリヒア・コリは、多量の遺伝子情報を利用することによりその遺伝子発現を最適化し得ることから、外来蛋白質の製造を目的とする多くの有用な細菌の一種である（ホーランド、I. B.等、「バイオテクノロジー」4:427（1986））。エシェリヒア・コリは、外来蛋白質の内部生産または細胞質からの蛋白質の分泌に使用され得、それらはペリプラズミック空間に蓄積されることが非常に多い（グレイ等、「ジーン」39:247（1985）、岡等、「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・エス・エー」82:7212（1985））。エシェリヒア・コリ細胞質からの分泌は、多くの蛋白質について観察され、シグナル配列を必要とする。細菌において内部生産される蛋白質は、正しく折り畳まれていることが少なく、細胞封入体と呼ばれる細胞レベル下の粒子中に沈澱する（ショーナー等、「バイオテクノロジー」3:151（1985））。しかしながら、細菌から分泌された蛋白質は、正しく折り畳まれていることが多く、天然二次および三次構造を呈する（シウング等、「バイオテクノロジー」4:991（1986））。免疫グ*50

*ロブリン・ペプチドは遺伝子工学によりエシェリヒア・コリンにおいて合成されているが（キャビリー等、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・エス・エー」81:3273（1984）、リウ等、「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・エス・エー」81:5369（1984）、ボス等「ヌクレック・アシッド・リサーチ」12:3791（1984）9、エシェリヒア・コリからの機能性抗体または抗体フラグメントとしてのこれらのペプチドの分泌については報告されていない。

Fab分子は、単一ジスルフィド架橋により連結された2種の異なる蛋白質鎖により構成される。これら2種の鎖は、無傷の抗体軽鎖並びに抗体重鎖、FdのV、JおよびC_H1部分である。L6キメラ軽鎖およびFd遺伝子の正しいcDNAクローンは既に同定されている。この実施例では、これらのcDNAクローンを、エルウィニア・カロトボラから得られたペクチン酸リアーゼ（pelB）遺伝子リーダー配列への遺伝子融合体として単一細菌オペロン（ジシストロン・メッセージ）中に組織し（レイ等、「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー」投稿中（1987））、2種の強力な調節プロモーターのいずれか一方から発現させた。その結果、エシェリヒア・コリにおける2種の蛋白質鎖の同時発現用システムが得られ、L6キ

キメラ抗体の免疫学的活性で正しく組立られたFabが培養生長培地に分泌された。

A. L6キメラFab用エシェリヒア・コリ発現システムの構築。

1. pelBリーダー配列カセットの組立。

エルウィニア・カトボラECは、幾つかのペクチン酸リアーゼ（ポリガラクトuron酸トランスーエリミナーゼ）をコードする（レイ等、「ジーン」35:63（1985））。3種のペクチン酸リアーゼ遺伝子がクローン化され、これらの遺伝子のDNA配列が決定された。強力なプロモーターの制御下でエシェリヒア・コリにクローン化されると、pelB遺伝子が発現され、大量のペクチン酸リアーゼアペリプラスミク空間に蓄積する。pelBシグナル配列はエシェリヒア・コリにおいて有効に機能し、この例では抗体遺伝子の分泌シグナルとして使用された。pelB遺伝子のシグナル配列を囲むヌクレオチド配列を第36a図に示す。

pelBシグナル配列は、シグナル・ペプチダーゼ開裂部位ala-alaに隣接したアミノ酸22にHae III制限部位を含む。プラスミド・ベクターpUC8（ビエイラおよびメシング、「ジーン」19:259（1982））中にpelB遺伝子を含む、プラスミドpSS1004（レイ等、「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー」、投稿中（1987））をHae IIIおよびEcoR Iにより消化した。このDNAを8塩基対Sst Iリンカーと共にSsp IおよびEcoR I切断したpBR322にライゲーションした。生成したプラスミドは、pelBの22アミノ酸リーダー配列を含む300bpフラグメントおよび約230bpの上流エルウィニア・カトボラDNAを含んでいた。このプラスミドpING173は、Sst Iによる消化およびT4 DNAポリメラーゼによる処理後、入来遺伝子とフレーム内機能性細菌リーダー配列を含む、蛋白質融合体を生成させる遺伝子の成熟暗号化配列の第一アミノ酸が側面に位置するDNAフラグメントに直接ライゲーションされ得る、挿入体を含む。pING173におけるSst I-EcoR I制限フラグメントをpUC18（ヤニッヒーベロン等、「ジーン」33:103（1985））へクローン化することにより、pRR175が生成される。これは、lacプロモーターの下流にpelBリーダーおよび隣接上流非暗号化配列（リボソーム結合部位を含む）を含む。pRR175の構築の概略を第36b図に示す。

2. 細菌発現用キメラL6軽鎖遺伝子の製造。

シグナル配列プロセッシング部位にAat II制限部位および遺伝子の下流に特有のBg III部位を含む無傷のL6キメラ軽鎖遺伝子を、酵母発現プラスミドpING1298（第25a図）から1200bpDNAフラグメントとして取り出した。このフラグメントをプラスミドpRR175に挿入した。生成したプラスミドpRR177-8は、pelBリーダーおよび親プラスミドに存するlacプロモーターの下流のL6軽鎖のフレーム内融合体を含んでいた。このプラスミドの幾つかの誘導体を構築して、pRR177-8におけるpelB軽鎖遺伝子

融合体の5' および3' 末端の両方から非暗号化配列を削除した。pelBリーダー配列開始コドン（第36図）から-48bpにおけるNde I制限部位を利用して上流非暗号化配列を削除すると、pRR180-2が得られた。酵母におけるL6軽鎖発現用に最適化されたプラスミドpING1431（第27a図参照）からのフラグメントをpRR179中に置き換えることにより、3' 非暗号化配列を削除すると、pRR191が生成した。別のプラスミドpRR190はpRR191と似ているが、軽鎖遺伝子の3' 末端に90bpの非暗号化真核生物DNAを含む。これらの構造を第37図に示す。

3. 細菌発現用キメラL6 Fd遺伝子の構造。

シグナル配列プロセッシング部位にSst I制限部位を含み、部位突然変異（第32a、b図）およびアミノ酸226に終止コドンを作成することにより導入されたbcl I部位および遺伝子の下流に特有のBamH I制限部位を含む無傷のL6キメラFd遺伝子を、880bpDNAフラグメントとしてプラスミドpING1406（第33図）から取り出した。このDNAフラグメントをプラスミドpRR175に挿入すると、pelBリーダー配列およびlacプロモーターの下流のL6 Fd遺伝子のフレーム内融合体、pRR178-5が生成された。幾つかの誘導体を構築して、pRR178-5に含まれる配列の5' および3' 末端の両方から非暗号化配列を削除した。Fd遺伝子の終止コドンの直後にXho Iリンカーを含む、酵母におけるL6 Fd発現用に最適化されたプラスミド、pING1428（第34図）からの制限フラグメントを置き換えることにより3' 非暗号化配列を除去すると、プラスミドpRR186が生成された。リーダー配列から48におけるNde I部位の上流のエルウィニア・カトボラDNA配列を除去すると、プラスミドpRR196が生成された。これらのプラスミドの構造を第38図に示す。

4. 軽鎖およびFd遺伝子用マルチシストロン発現システム。

細菌により誘導されたFabを製造するためには、軽鎖およびFdの両方が細胞内で同時に製造される必要がある。これらの遺伝子の各々により別々に構築されたプラスミドを用いて、単一プロモーターからの転写が両遺伝子を特定するように配列された両遺伝子を含む一連の発現ベクターを構築した。これは、2種の遺伝子間の非暗号化DNAを60bpに最小限化する方式で行なわれた。各遺伝子は、翻訳開始に必要なとされるリボソーム結合部位および48からpelBリーダー::抗体遺伝子ジャクソンまで同一のDNA配列を有する。2種の遺伝子を一直線に並べるためには、幾つかのクローニング段階が必要であった。pRR180-2においてpelBリーダーに連結された軽鎖遺伝子の一部分を、pRR186におけるFd遺伝子の下流にクローニングすることにより、pFK100が生成された。軽鎖遺伝子の残りをpRR177-8からpFK100にサブクローニングすることにより、pFK101が生成された。同様に、pRR190およびpRR191からの真核生物配列の3' 欠失を含むDNAフラグメントをpFK101へクローン化することにより、p

101

FK103およびpFK102が各々生成された。pRR192およびpFK101からのDNAフラグメントをライゲーションすると、pFK104が生成された。これは、Fd遺伝子から-48bpの上流配列の欠失を含む。これらのプラスミドにおけるFdおよび軽鎖遺伝子カセットの地図を第39図に示す。

5. 誘導性プロモーターの制御下における軽鎖およびFdに関するジストロン・メッセージの配置。

プラスミドpFK101、pFK102、pFK103およびpFK104は、ベクターpUC18またはpUC19においてlacプロモーターの制御下で連続的にクローン化されたFdおよび軽鎖遺伝子を含む。エシェリヒア・コリ株、例えばJM103 F' lacI0 (メッシング等、「ヌクレイック・アシッド・リサーチ」9:309 (1981)) の場合、ペリプラスムに蓄積する軽鎖の量は、lacプロモーター誘導剤イソプロピルβ-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) による影響は受けない (第13表参照)。さらに、細菌の生長は遅く (pUC18を含む細胞と比較して)、細胞コロニーは、小さく乾燥して粗い改変された形態を呈し、構成外来遺伝子の発現が細胞生長に有害であることを示唆している。2つの戦略を用いることにより、さらに厳密に調節されたプロモーターの下でこの遺伝子カセットを配置した。

第一に、pFK104からのPat I-EcoR Iフラグメントを、pIT206にライゲーションすることにより、エシェリヒア・コリにおける強力なプロモーターとして充分に特定されているサルモネラ・チフィリウムaraBプロモーターの直接制御下でFdおよび軽鎖遺伝子カセットを配置した。pIT206制限地図およびpIT104の構造を第40図に示す。細菌遺伝子の発現におけるaraBプロモーターおよびその調節蛋白質araCの使用については、アメリカ合衆国特許出願695309 (1985年1月26日付) および797472 (1985年11月13日付) に記載されている。第14表に示す通り、アラビノースを培養生長培地へ加えることにより、生成したプラスミドpIT104を軽鎖合成用に調節する。アラビノースを加えることにより、少なくとも10倍の誘導が行なわれる。これは、Fab遺伝子の高レベルの発現が細胞の生長に有害であることを確認している。アラビノースの非存在下で生長させた場合、pIT104を宿す細菌コロニーは、pIT206を宿すエシェリヒア・コリとは表現型的に区別がつかない。

第二に、lacI遺伝子を含むDNAフラグメント、lacプロモーターのリプレッサーを、高度コピー発現ベクターpFK102にクローン化した。高コピー数ベクターからのlacIの発現は、高コピー数ベクターにおけるlacプロモーターの発現の調節に有用である (ラッセル等、プラスミド、投稿中 (1987)、スイング等、「バイオテクノロジー」4:991 (1986))。pMC9 (カロス等、「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・ス・エー」80:3015 (1983)) におけるlacI遺伝子を含む1.7kb EcoR Iフラグメントを取り出し、T4ポリメラーゼによりプラント末

102

端にし、Pst Iリンカーとライゲーションし、pFK102の特有のPst I部位にクローン化することにより、pFK102lacIが生成された。pFK102lacIの地図を第40b図に示す。正確なクローンの同定に使用される選択方法により、生成したプラスミドpFK102lacIが、機能的に抑制されたlacプロモーターを含むことを確かめた。マッコンキーラクトース・プレート上の白色または明るいピンク色のコロニーは全て、lacI挿入体を有するプラスミドを含んでいたが、pFK102のみを含む形質転換体は赤かった。これは、高コピー数lacI遺伝子によるlacプロモーターの機能的抑制を示している。第14表は、pFK102lacIを含む細胞からの細菌性Fabの発現がpFK102からの発現と類似していることを示している。異常型コロニーを形成し、ブロス培養でゆっくりと生長したpFK102を含む細胞とは異なり、pFK102lacIを含む細胞は、pUC18を含む細胞と似ていた。

B. 細菌により産生されるFabの発現、SDS-PAGEおよび精製。

1. クローン化された抗体遺伝子を宿すエシェリヒア・コリの培養。

標準エシェリヒア・コリ形質転換方法により、プラスミドDNAをエシェリヒア・コリJM103またはMC1016に形質転換した。適当な抗生物質 (ペニシリン250μg/ml、テトラサイクリン15μg/ml) を補ったTYE (トリプトン1.5%、酵母抽出物1.0%およびNaCl0.5%) において細菌培養を生長させた。細菌培養を5ml〜1リットルの容量で光学密度OD600=0.8 (約4×10⁸細胞/ml) に37°Cで生長させ、IPTG (0.2ミリモル)、ラクトース (1.0%) またはアラビノース (1.0%) を用いてアリコートで誘導した。さらに4〜21時間培養を生長させた。各培養の一部分を軽鎖生成について分析した。柳田等 (ジャーナル・オブ・バクテリオロジー 166:937 (1986)) に記載された浸透圧ショックにより、エシェリヒア・コリ細胞のペリプラスミク空間から蛋白質を放出させた。別法として、培養上清を抗体鎖の存在について直接検定した。

L6軽鎖の定量には、ヤギ抗ヒト・カッパ軽鎖抗体 (カッペル、マルバーン、ペンシルベニア) によるELISAを用いた。Fdは、マウス・モノクローナル抗ヒトFd抗体 (カルビオケム、サンディエゴ、カルフォルニア) を用いたELISAにより検出され得る。第13表は、エシェリヒア・コリ・ペリプラスミク抽出物における軽鎖反応性物質の発現に関する代表的データを示す。軽鎖は、細菌細胞質からペリプラスム中に分泌される。また、抗体鎖は細菌から培養上清中へ放出される。これは異常な発見であり、エシェリヒア・コリにおいて発現された真核生物蛋白質の間でもL6Fab独特の特性であり得る。しかしながら、ある種の条件下では、細菌蛋白質はエシェリヒア・コリから放出されることが知られている (アブラーモン等、「ヌクレイック・アシッド・リサーチ」14:7

487 (1986)、ページス等、「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー」169:1386 (1986))。第14表は、ペリプラズム中に分泌された軽鎖の量を、培養上清中に分泌された量と比較している。軽鎖反応性物質は、クローン化された軽鎖単独または軽鎖Fdを宿主プラスミド含有培養物に存在する。Fabの最も優れた生産体 (pFK102、pFK104およびpFK102laci) は、代表的には培養培地中へ300-1000ng/mlのELISA反応軽鎖を分泌する軽鎖遺伝子の次にFd遺伝子が続く別の構築物を作製した (pFK107)。この構築物は、反応順序での遺伝子による構築物と似たレベルでFabの合成および分泌を指図する。すなわち、遺伝子の順序はFabの分泌にとって厳密なものではない。

2. 細菌により生成されたキメラL6軽鎖およびFdのSDS-PAGE。

細菌により生産された抗体鎖を、還元および非還元条件下でポリアクリルアミド・ゲル電気泳動により分析した。溶解した全細菌細胞の蛋白質抽出物、浸透圧ショックによりペリプラズミク空間から放出された蛋白質および培養上清中に分泌された蛋白質を電気泳動法により分析した。ウエスタン分析による完全な還元条件下でのゲル分離蛋白質のニトロセルロースへの移動およびヤギ抗ヒト軽鎖抗体を用いた免疫学的染色は、本物のL6キメラ軽鎖と同じ分子量の蛋白質が存在する (約23Kd) ことを示した。非還元条件下でのSDS-PAGEによる蛋白質試料の分析は、軽鎖遺伝子のみを有するプラスミド (pRR191またはpRR190) を宿主細胞からの抽出物が、さらに高分子量形態に会合した軽鎖反応性物質を大きな比率で含むことを示した。この物質の多くは、軽鎖2量体であると思われるものにおいて約46Kdで移動した。軽鎖2量体は、軽鎖のみを生産するミエローマ細胞から観察された。また、軽鎖およびエシェリヒア・コリ蛋白質間に非特異的ジスルフィド形成を示し得る他の免疫反応性蛋白質バンドが存在する。軽鎖およびFd遺伝子の両方を宿主エシェリヒア・コリ細胞からの蛋白質試料 (ペリプラズミク抽出物または培養上清) は、非還元性ゲル条件下で分離された場合、細菌性軽鎖2量体よりも僅かに高い分子量で移動する約48Kdにおける軽鎖反応性バンドを含む。この物質は、細菌により生産されたL6キメラFabである。pFK102laci、pFK101、pFK102、pFK103またはpFK104を宿主エシェリヒア・コリにおいて、非還元条件下で行なわれたSDSゲルにおいて観察される48Kdバンドは、最も著しく免疫反応性を示す種類である。さらに、軽鎖のみを含む抽出物で見られる免疫反応性蛋白質の基底値スミアは、軽鎖およびFdを共に含む細胞からの抽出物の場合では大きく減少する。

3. 細菌により生産されたキメラL6 Fabの精製。

免疫学的および機能的活性 (下記参照) 細菌性Fabを、pFK102laciまたはpIT104を宿主エシェリヒア・コリの培養上清またはペリプラズミク蛋白質抽出物から精製した。ペリプラズミク物質を精製するために、4時

間誘導された細胞1リットルから得られたペリプラズミク・フラクションを50mlの蒸留水中に放出した。この物質を20分間5000Gで遠心分離にかけ、0.45μmフィルターによりろ過した。次いで、ペリプラズミク抽出物をYM10膜 (アミコン) により約5mlに濃縮した。この物質を出発緩衝液 (10ミリモルK₂HPO₄ D、pH7.5) による8倍に希釈し、10ml/分の流速で1ml S-セファロース・カラムに適用した。カラムを25mlの出発緩衝液で洗浄し、出発緩衝液中0-200ミリモルNaCl勾配により溶離した (全容量200ml)。免疫反応性勾配ピークをブールし (溶離は約100ミリモルで行なわれた)、セントリコン10で濃縮した。精製FABをPHBS+2.0%BSA中で貯蔵した。

1リットルの細胞培養上清から分泌されたFabを精製するために、誘導剤により21時間生長させた後、遠心分離により細胞を除去し、上清を0.45μmフィルターによりろ過した。培地をYM10膜 (アミコン) により約16mlに濃縮し、次いで10ミリモルK₂HPO₄で105mlに希釈した。この物質を1.6ml S-セファロース・カラムに適用し、40ml 0-200ミリモルNaCl勾配により溶離した。S-セファロース・クロマトグラフィーから回収されたFabは、非還元性クーマシー染色10%アクリルアミドゲルのデンストメーター追跡により測定したところ、70%より高い純度であった。細菌培養上清から精製されたFabは、15%還元性ゲルにおいて約23Kdおよび24.5Kdの2つの主たる蛋白質バンドに分解する。DNA配列に基づいたFdおよび軽鎖の分子量は、24.5Kdおよび23Kdであり、これは観察された蛋白質サイズと明確に対応している。2つのバンドのうち小さい方は、ウエスタン・プロットにおいてヤギ抗ヒト・カッパ軽鎖抗血清と強く反応した。ペリプラズミク空間または細菌培養上清から精製された細菌性Fabは、上記で試験したどの分析基準を用いても区別がつかない。

4. L6抗原に対する細菌産生キメラL6 Fabの機能的結合活性。

S-セファロース・クロマトグラフィーにより精製された細菌産生Fabを、L6抗原含有細胞への結合について試験した。第15表で示す通り、細菌性Fabは、ヒト結腸癌セルライン3347と特異的に結合する。TセルラインT51から得た細胞を陰性対照として用いた。標的細胞を、細菌産生L6キメラFab、Sp2/0細胞で産生された無傷のL6キメラ抗体またはマウスの腹水から精製されたマウスL6抗体と4℃で30分間インキュベーションした。その後、Fab検出用のFITC標識ヤギ抗ヒト軽鎖抗体、キメラ抗体検出用のFITC標識ヤギ抗ヒト免疫グロブリン、またはマウス抗体検出用のFITC標識ヤギ抗ネズミ免疫グロブリンとインキュベーションした。コールター・モデルEPIC-C細胞ソーターを用いて、細胞表面に結合する抗体を測定した。

細菌産生Fabはまた、抗原陽性3347結腸癌細胞表面に

105

対するFITC標識マウスL6抗体の特微的な結合阻害を呈する。細菌産生FabおよびSp2/0誘導キメラL6が似た結合阻害プロフィールを有するという事は、細菌産生FabおよびSp2/0誘導キメラL6の結合活性が類似していることを示唆している。

結論

エシェリヒア・コリを宿主として用いることにより、免疫グロブリンの機能的活性Fab領域を製造し、これらをペリプラズミック空間中および培養培地において分泌させる新規方法が開示されている。この分子は、適切に組み立てられた抗体認識部位の予期される結合特性を呈する。この技術を用いることにより、エシェリヒア・コリにおいて他の結合特異性を有する抗体遺伝子を発現させることができる。

1. 修飾抗体cDNAクローンによりコードされる蛋白質は、シグナル配列を用いて細菌から分泌され得る。
2. 2種の抗体遺伝子が、ジシストロン・メッセージとして単一細菌性プロモーターから発現され得る。
3. 2種の外来蛋白質（この実施例では抗体軽鎖およびFd）が、適切に組み立てられ得、すなわち、細菌から分泌された場合、正確な二次、三次および四次構造を呈する。

106

- *4. 少なくとも2種、恐らくは多くの細菌性プロモーターが、抗体遺伝子の発現に使用され得る。

5. この実施例は、他の抗体鎖をコードする遺伝子がジシストロン・メッセージとして一緒に発現され得る一般的方法である。これらは、軽鎖およびFd遺伝子または軽鎖および無傷の重鎖遺伝子を含む。

6. プロモーターに関する遺伝子順序は、エシェリヒア・コリのFab産生能において重要ではない。Fd遺伝子の後に軽鎖を構築した場合、逆の順序で遺伝子を組織した場合と同じ機能を有する。

7. Fabは、エシェリヒア・コリから培養上清中に分泌され得、そこで、それは安定しており、精製され得る。細胞質膜を通る大部分のFab鎖は、培養上清中に分泌される。

微生物寄託

サッカロミセス・セレビシアBB331C (41/42-5)、G187は、1987年7月9日ATCCに寄託され、受け入れ番号20856が与えられた。エシェリヒア・コリJM193 (pFK102lacI)、G186もまたそこに同じ日付で寄託され、受け入れ番号67457が与えられた。両寄託はブタベスタ条約に基づくものであった。

* 第13表

エシェリヒア・コリのペリプラズムから得られた軽鎖の定量

プラスミド	ng/μl(培養)	
		+
pRR175	0	0
pRR177-8	8.5	11
pRR180	399	412
pRR190	200	241
pRR191	463	772
pFK101	36	28
pFK102	68	55
pFK103	38	45
pFK104	91	68

エシェリヒア・コリJM103またはMC1061（結果は類似）を各プラスミドにより形質転換した。新鮮な形質転換体を37℃でOD₆₀₀=0.8にTYE中で培養した。培養物を

※分割し、誘導剤 (IPTG) を0.2ミリモル〜1アリコートに加えた（または+IPTG）。細胞を37℃で時間生長させた。ペリプラズミック蛋白質抽出物を調製し、アリコ

107

108

ートを、ヤギ抗ヒト・カッパ抗体を用いたELISAにより
軽鎖に関して試験した。各値は、少なくとも2つの独立
した実験の平均である。抗体遺伝子に対する非暗号化配*

*列5' および3' 両末端を除去すると。ペリプラズムに
おける軽鎖の蓄積が増加した。

第14表

誘導後の上清およびペリプラズムにおける軽鎖の蓄積

プラスミド	誘導剤	上清		ペリプラズム	
		4時間	21時間	4時間	21時間
pRR190	-	0	nd	200	nd
pRR190	+	5	188	241	nd
pFK102	-	12	nd	68	nd
pFK102	+	57	828	55	40
pFK104	-	13	nd	91	nd
pFK104	+	150	290	68	35
pFK102laci	-	25	360	50	100
pFK102laci	+	72	606	37	40
pIT104	-	13	nd	10	nd
pIT104	+	150	216	19	35

プラスミドを含むエシェリヒア・コリ株を生長させ、
調製し、第13表における記載と同様に検定した。pRR19
0、pFK102、pFK104およびpFK102laciについては、0.2ミ
リモルIPTGにより細胞を誘導した。1%アラビノースに
よりpIT104を誘導した。各値は、少なくとも2つの独立*

※した実験の平均である。エシェリヒア・コリ培養上清を
分析するため、細菌を遠心分離により除去し、培養上清
を0.45μMフィルターに通した。値をng/ml (培養) で
表す。

nd-測定されず。

第15表

細菌性Fabの結合検定

抗体	結合割合*	
	3347細胞 L6+	T51細胞 L6-
標準マウスL6	95	1
Sp2/0キメラL6	116	1
細菌性L6Fab	54	1
標準L6Fab	16	1

*結合割合は、FITCコンジュゲート第二抗体で処理した対照

試料と比べて、試験試料の場合が何倍明るいかを示した数である。

マウスL6抗体の酵素消化により標準L6Fabを調製した。

微生物

(寄託機関の名称)

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション

(寄託機関の住所)

12301 パークローン・ドライブ

ロックビル、メリーランド20852、アメリカ合衆国

(寄託日) (受け入れ番号)

1986年11月14日 HB9240

(追加表示)

ハイブリドーマC255 (キメラL6抗体)

ヨーロッパ特許が求められる指定国に関して、寄託された微生物の試料は、ヨーロッパ特許の付与の告示が公表されるまで、または出願が拒絶されもしくは取り下げられ、または取り下げられたとみなされる日まで、その試料を要求する人により指定された専門家に対して前記試料を供給する場合のみ利用可能である(規則28(4)EPC)。

*微生物

(寄託機関の名称)

アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション

30 (寄託機関の住所)

12301 パークローン・ドライブ

ロックビル、メリーランド20852、アメリカ合衆国、

(寄託日) (受け入れ番号)

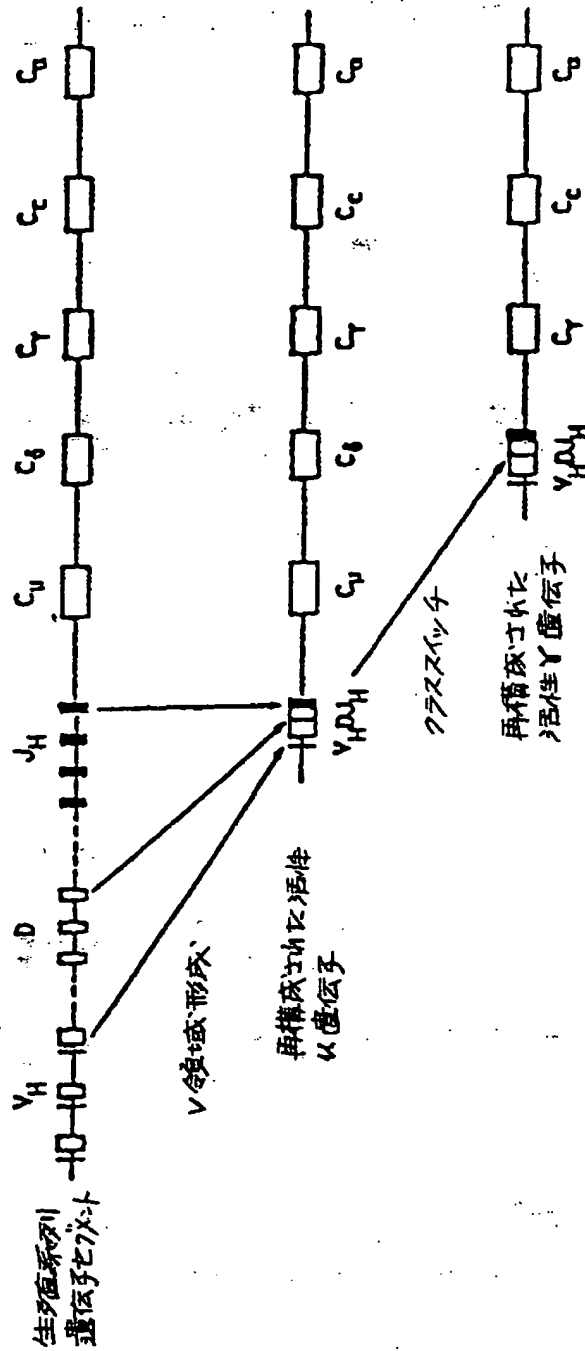
1986年10月24日 HB9241

(追加表示)

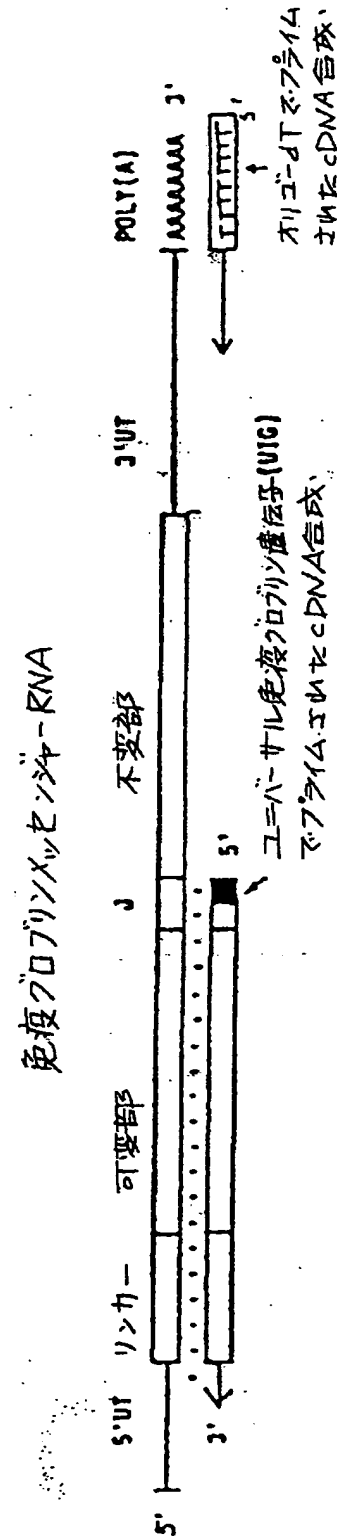
ハイブリドーマC256 (キメラL6抗体)

ヨーロッパ特許が求められる指定国に関して、寄託された微生物の試料は、ヨーロッパ特許の付与の告示が公表されるまで、または出願が拒絶されもしくは取り下げられ、または取り下げられたとみなされる日まで、その試料を要求する人により指定された専門家に対して前記試料を供給する場合のみ利用可能である(規則28(4)EPC)。

【第1図】



【第3図】



【第2図】

I_g 重鎖J-C領域ヒト重鎖J領域

J | CH1

JB1 CCTCAATACTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAG
 JB2 CTACTGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCTGGTCACCTGTCTCCTCAG
 JB3 ATGCTTTTTCATGCTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAG
 JB4 ACTACTTTTCACTACTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAG
 JB5 ACACTGGTTCCACTCTCTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAG
 JB6 AT(TAC)₅ GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCAAGGTACCGTCTCCTCAG
 コンセンサス TCGACCTCTGGGGCCAAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAG

マウス重鎖J領域

J | CH1

JB1 TACTGGTACTTCGATGCTCTGGGGCCAGGGACCAAGGTACCGTCTCCTCAG
 JB2 TACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAG
 JB3 CCTGGTTTTCCTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAG
 JB4 TACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG
 コンセンサス TTGACTACTGGGGCCAAGGGACCAAGGTACCGTCTCCTCAG

I_g 軽鎖J-C領域ヒトカッパJ領域

J | C

JK1 GCACGTTCCGGCCAAAGGACCAAGGTGGAAATCAAAC
 JK2 ACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAAC
 JK3 TCACTTTCCGGCCCTGGGACCAAGGTGGATATCAAAC
 JK4 TCACTTTCCGGCCAGGGACCAAGGTGGAGATCAAAC
 JK5 TCACCTTCCGGCCAAAGGACCAAGGTGGAGATTAAC
 コンセンサス TTCCGGCCAAAGGACCAAGGTGGAGATCAAAC

マウスカッパJ領域

J | C

JK1 TGGACGTTCCGGTGGAGGACCAAGCTGGAAATCAAAC
 JK2 TACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC
 JK3 TTCACATTCACTGATGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC
 JK4 TTCACGTTCCGCTCCGGGACCAAGTTGGAAATAAAAC
 JK5 CTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC
 コンセンサス TTCCGTTCCGGGACCAAGCTGGAAATAAAAC
 UIC[HK] TGGTTCACCTTTATTTG₅

ヒトラムダショートJ領域

J | C

JPSL1 CACATGTTTCCGACCAAGACCCAGCCCACTGTCTTAG

マウスラムダJ領域

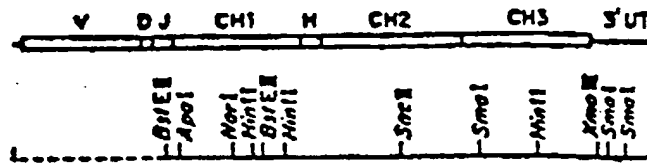
J | C

JL1 TGGGTGTTCCGGTGGAGGAACCAAACTCACTGTCTTAG
 JL2 TATGTTTTCGGCGGTGGAACCAAGGTCACTGTCTTAG
 JL3 TTTATTTTTCGGCAGTGGAAACCAAGGTCACTGTCTTAG
 コンセンサス TTCGGCGGTGGAACCAAGGTCACTGTCTTAG

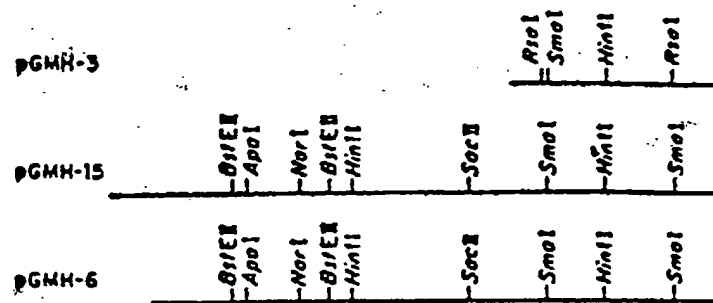
【第4図】

A. ヒト IgG1 遺伝子の合成

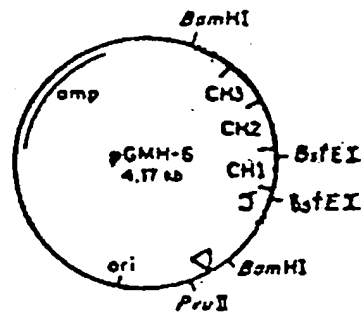
a. ヒト IgG1 重鎖構造



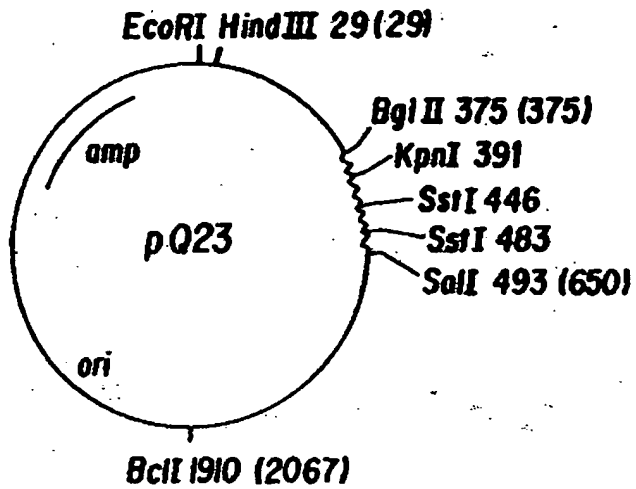
b. cDNA フローン



B. V領域モジュール挿入のためのヒト IgG1 不変部クローニングベクター

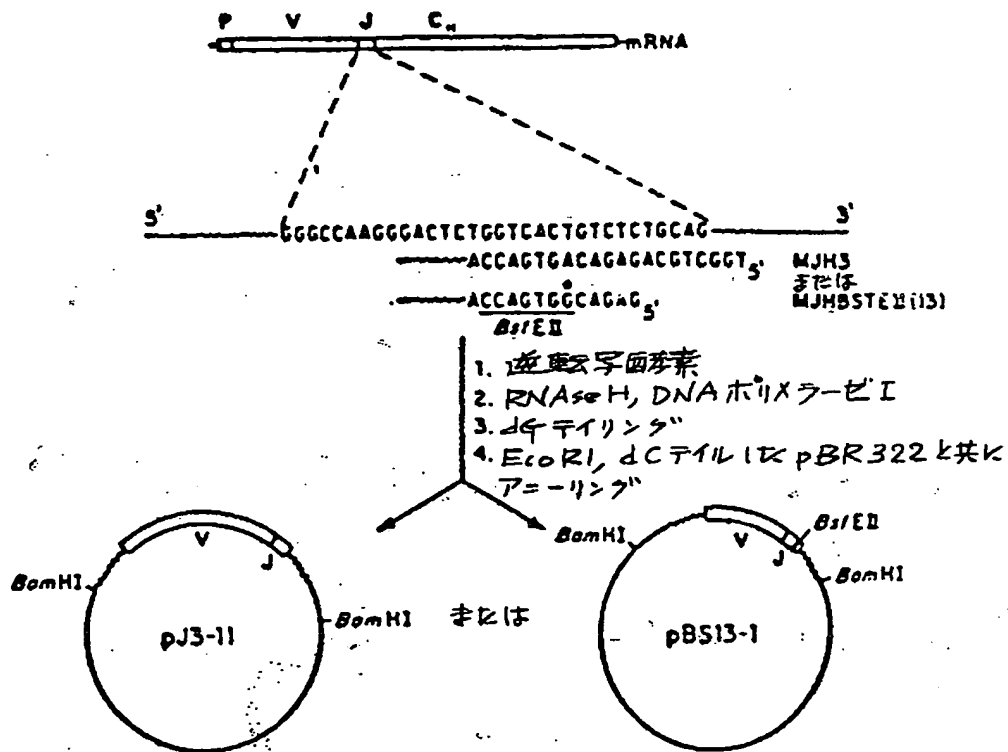


【第5図】



【第8図】

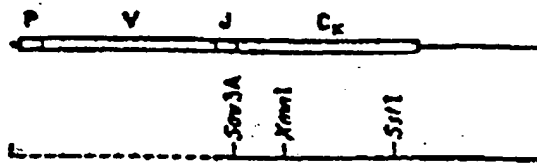
重鎖V領域モジュール遺伝子合成



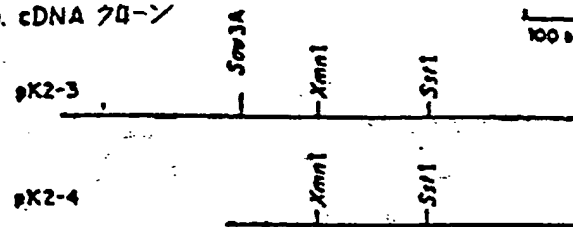
【第6図】

A. ヒト IgK 遺伝子の合成

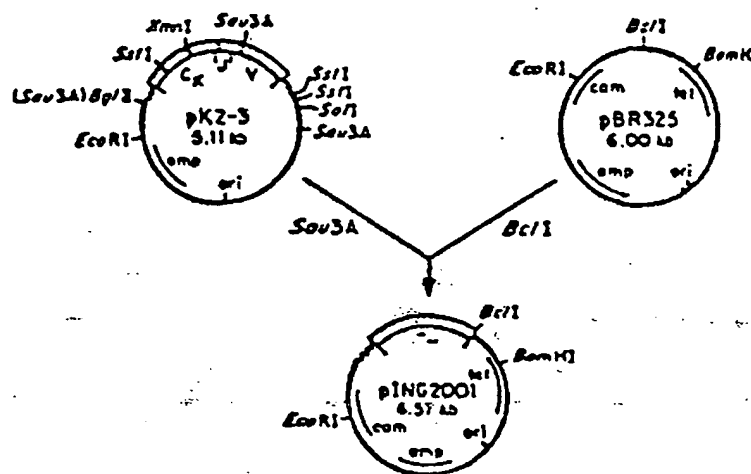
a. ヒト IgK 軽鎖構造



b. cDNA クロニ



B. ヒト Cκ 領域クローニングベクターの構築



【第7A図】

IgV領域合成のためのプライマーのデザイン

A. Ig重鎖J-C領域

—J部—+—C部—

ヒトIgG1 pGMH-6

GGTACCTGCTCTCTGAG CTTTCCAGAGGGCTCAT
 B6.23

マウス重鎖J領域およびプライマー

J1 TACTGGACTTGGATGTTGGGGCCAGGACCACTGTCAGTTCTTTCAG
 B6.23 CCGACTGGCAGCAGCACTTGGT
 J2 TACTTTCATCTGCGGCTCAAGCCAGCACTCTCAGCTTCTTTCAG
 B6.23 CAGAGTGTGAGAGCACTTGGT
 J3 CCGCTTTCTCTACTGGGGCCAGGCACTCTGCTCACTGTTCTTCAG
 B6.23 ACTAGTGCAGCAGCACTTGGT
 B6.23-ESTED TCTTTCAGACTAGTGGCAGAG
 B6.23-ESTED (13) ACTAGTGCAGAG
 B6.23-ESTED (13) B6.23
 J4 TACTATGCTATGCACTACTCGGTCAGGCACTTCACTGTCCTTCTTCAG
 B6.23 GTCACTGGCAGCAGCACTTGGT

ミスマッチ

	J1	J2	J3	J4
3	0	4	4	1
3	4	1	1	4
3	4	1	1	1
3	3	1	1	1
3	1	4	1	1
4	1	4	1	1

B. Igカッパ鎖J-C領域

—J部—+—IgK不変部—

ヒトカッパK2-3
PING 2001

CTGACATGAAC GACTGTGCTGCTCACTTGTCTTCACTTTTC
 B6.12 TTTTCAAC GACTGTGCTGCTCACTTGTCTTCACTTTTC
 B6.12

マウスカッパJ領域およびプライマー

J1 TGCAGTTTCTGCTGAGCCAGCACTGCAATGAAC
 B6.12 CCAAGCTCACTTCTGTC
 J2 TACAGTTTCTGAGCCAGCACTGCAATGAAC
 B6.12 CTTTCTGCTGCTTCACTTCACTT
 B6.12 CTGCAAGCTTCTTCTGTC B6.12
 J3 TGCAGTTTCTGCTGAGCCAGCACTGCAATGAAC
 B6.12 CCAAGCTCACTTCTGTC B6.12
 J4 CTGAGTTTCTGCTGAGCCAGCACTGCAATGAAC
 B6.12 CCAAGCTCACTTCTGTC
 J5 CTGAGTTTCTGCTGAGCCAGCACTGCAATGAAC
 B6.12 CCAAGCTCACTTCTGTC
 J6 TCTTTCAGCTTTTCTTTC

ミスマッチ

	J1	J2	J3	J4	J5	J6
3	0	1	4	1		
3	1	1	1	1		
3	4	1	0	4		
3	1	1	1	4		
3	1	1	4	1		
3	1	0	2	1		

【第7B図】

c. マウス可変部コンセンサプライマー

マウス重鎖Jセグメント

JH1	TACTGGTACTTCGATGCTCTGGGGCGCAGGGACCAC	GGTCACC	GTCTCTCA
JH2	TACTTTGACTACTGGGGCCAAGGACCAC	GGTCACC	GTCTCTCA
JH3	CCTCGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGAC	GGTCACC	GTCTCTCA
JH4	TACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGACCAC	GGTCACC	GTCTCTCA

コンセンサプライマー: UIG-H

AGGGACCAC GGTACC GTCTC

BstEII
TCCCTGGTG CAGTGG CAGAG
3' 5'

マウス軽鎖Jセグメント

JK1	TGGACGTTCCGTGGAGGACC	AAGCTT	GATCAAA
JK2	TACACGTTCCGAGGGGGACC	AAGCTT	GATATAAA
JK4	TTACGTTCCGCTCGGGGACC	AAGCTT	GATATAAA
JK5	CTCACGTTCCGTGCTGGGACC	AAGCTT	GAGTGAAA

コンセンサプライマー: UIG-K

GGGACC AAGCTT GAG

BstEII

CCCTGG TTGAA CTC
3' 5'

pGHL60

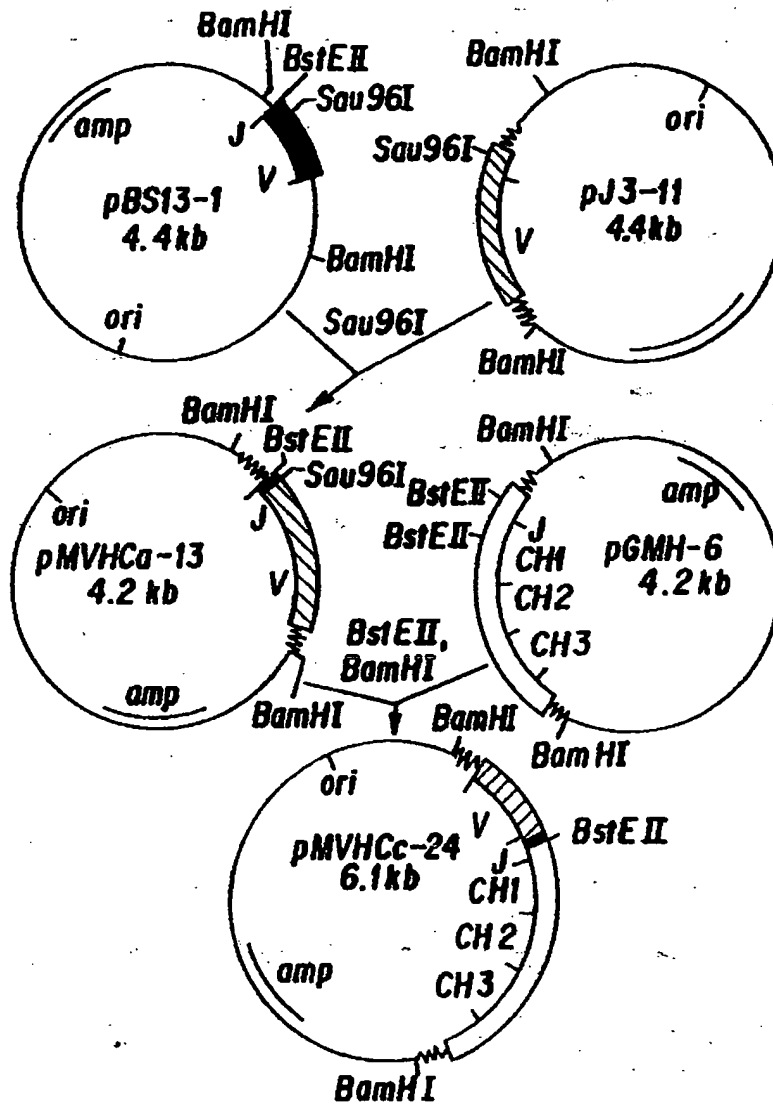
GCAGGGACC AAGCTT GAGATCAAA
-----C-T-----
BstEII

d. マウスδ2α J/C シャンクシオンプライマー

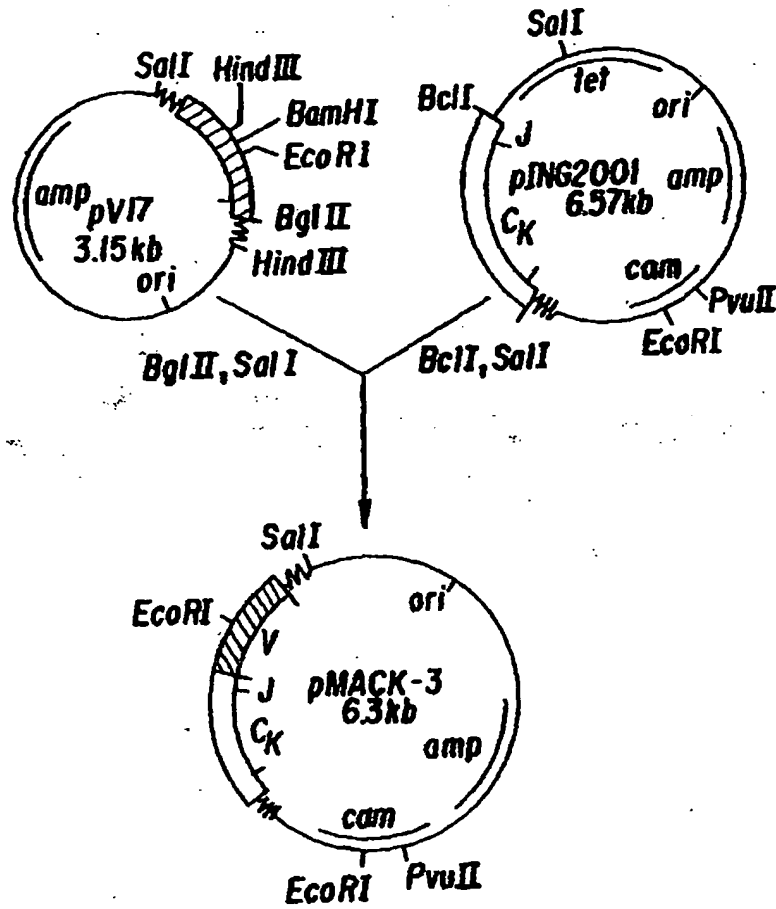
MJ_B2-ApaI

TGTGACAGGAGTCGGTCGTGTTCCCGGCTA
3' ApaI 5'

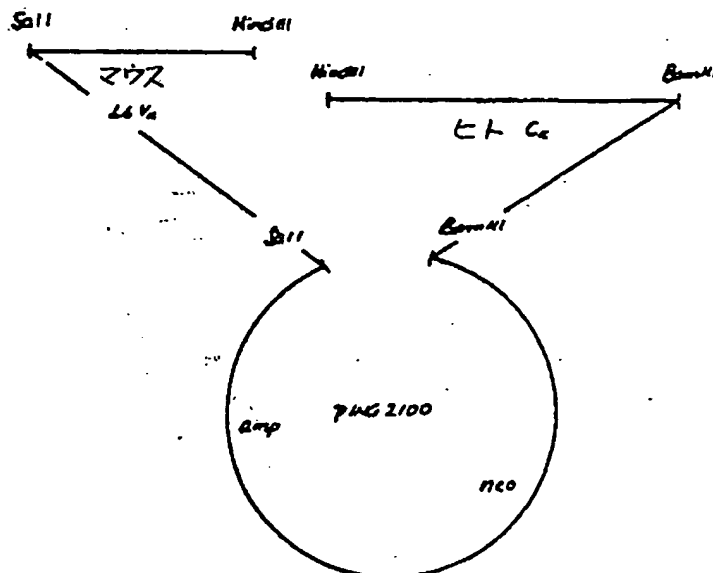
【第9A図】



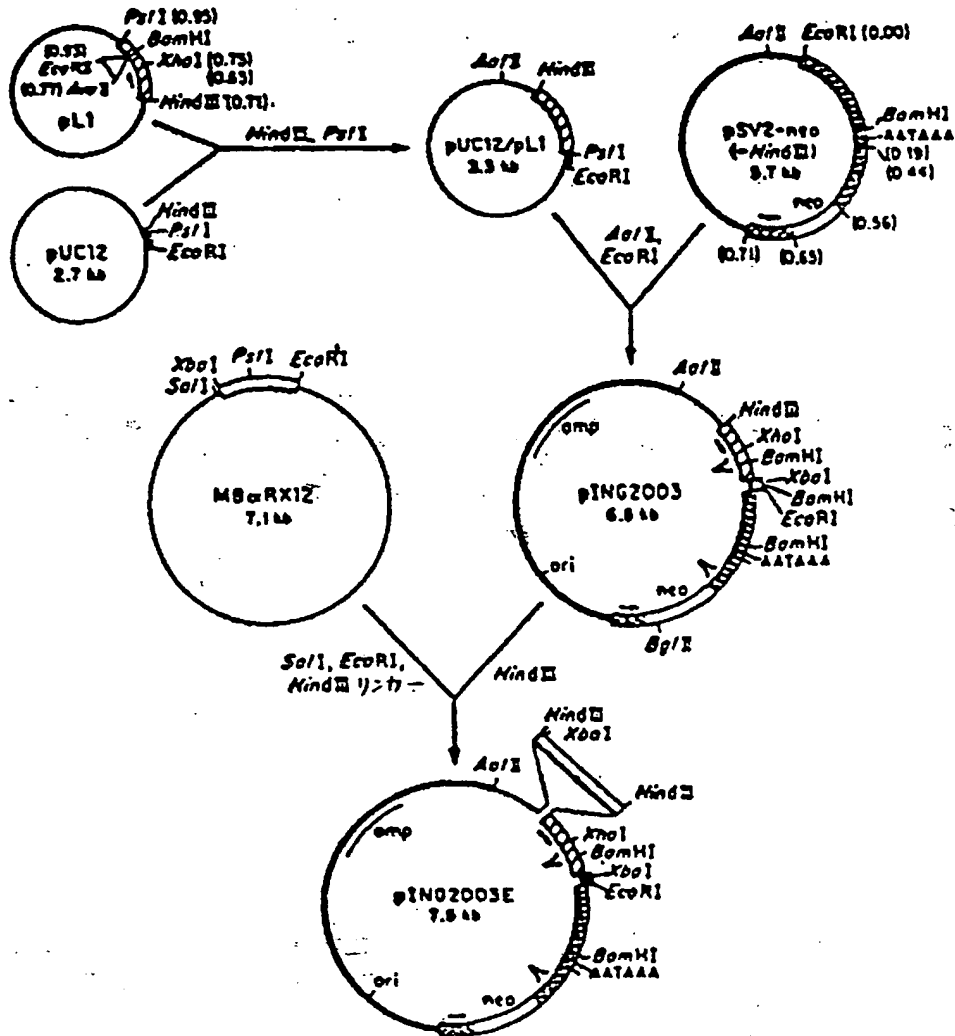
【第9B図】



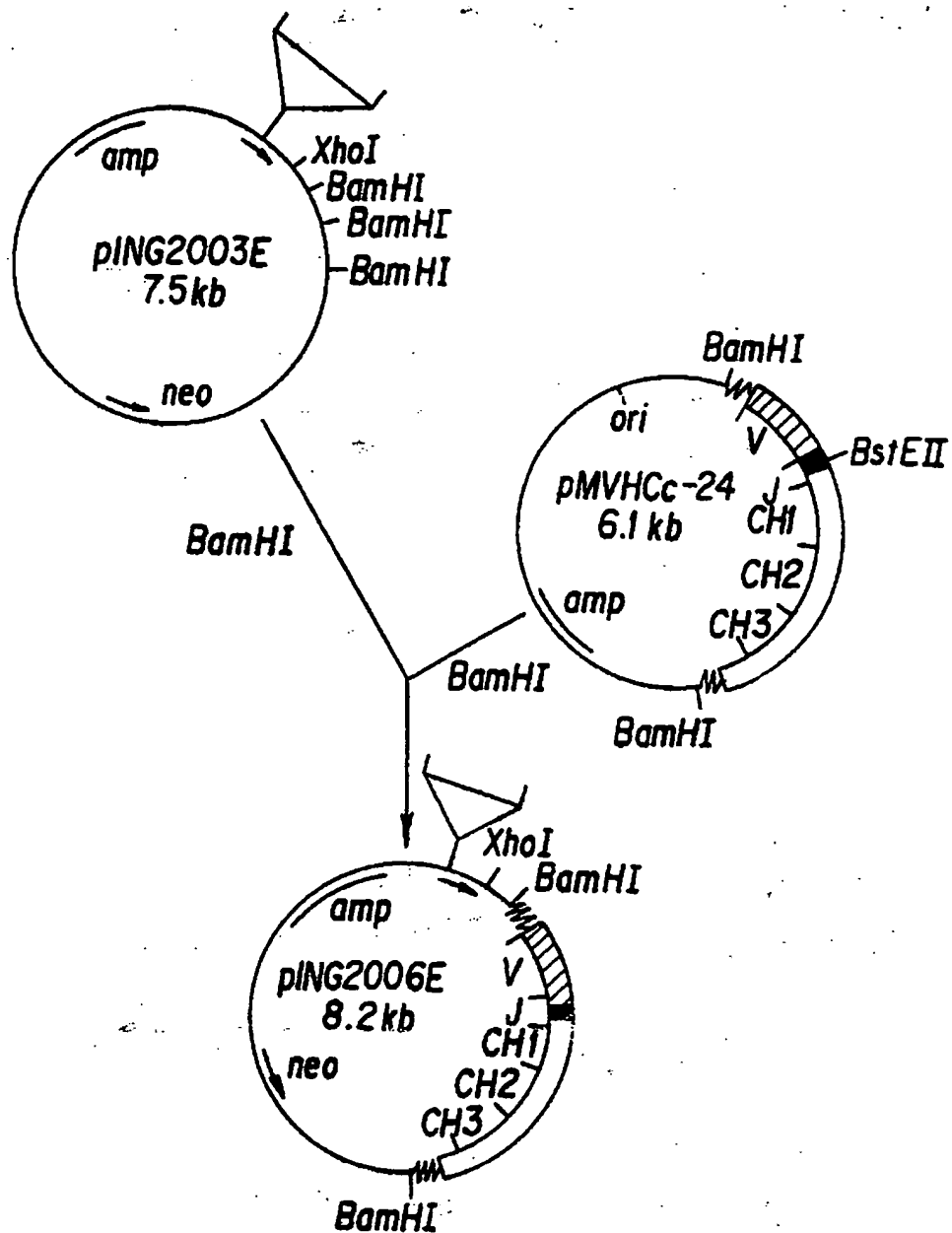
【第18図】



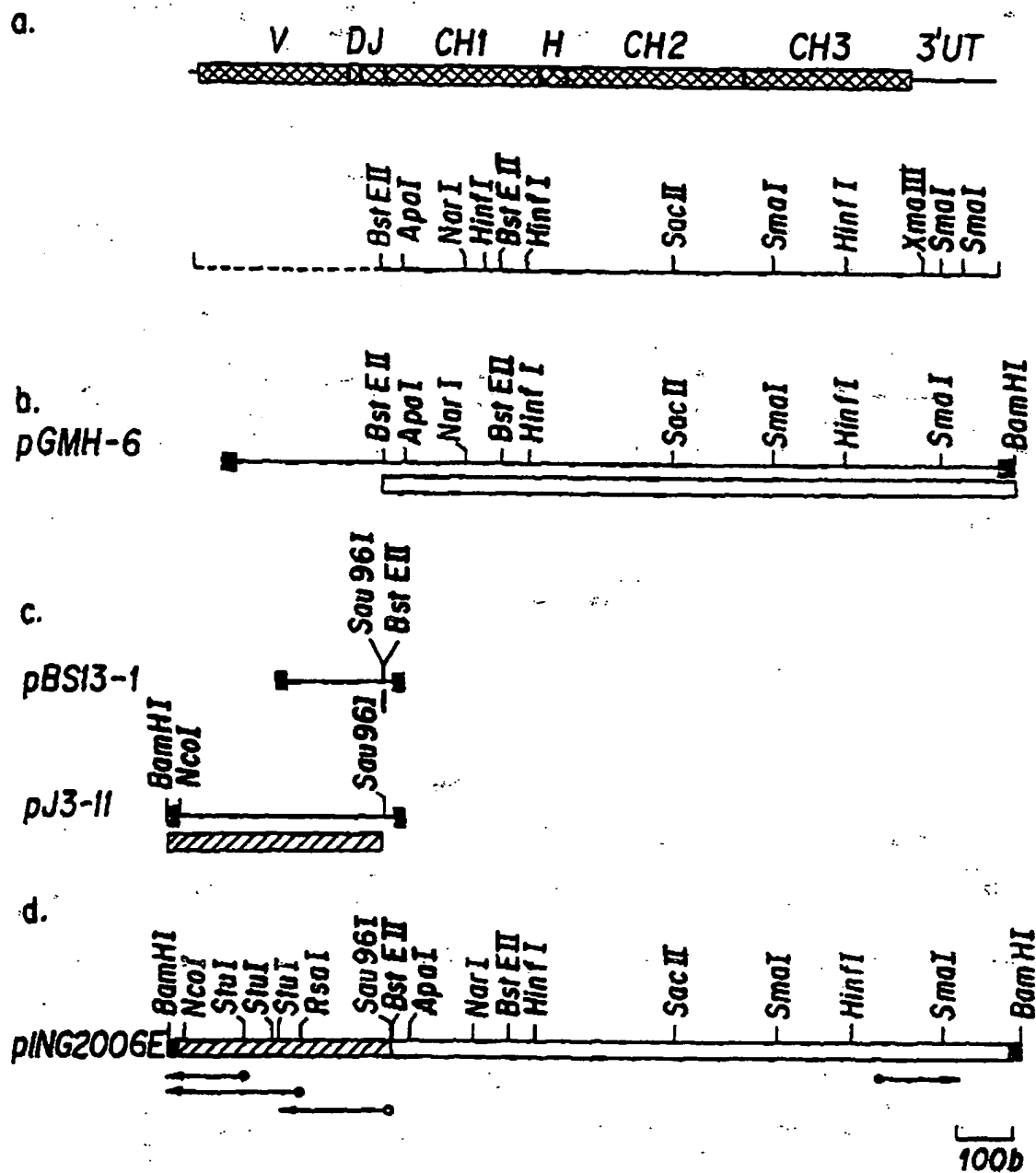
【第10図】



【第11図】



【第12A図】

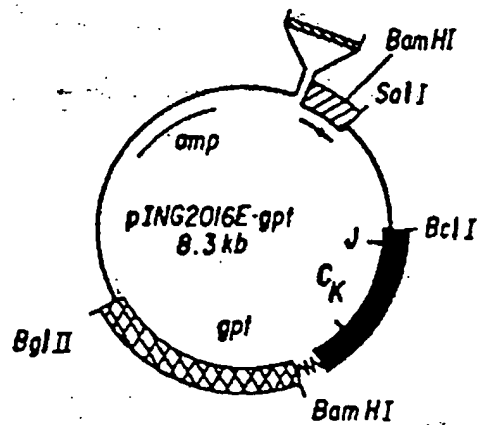
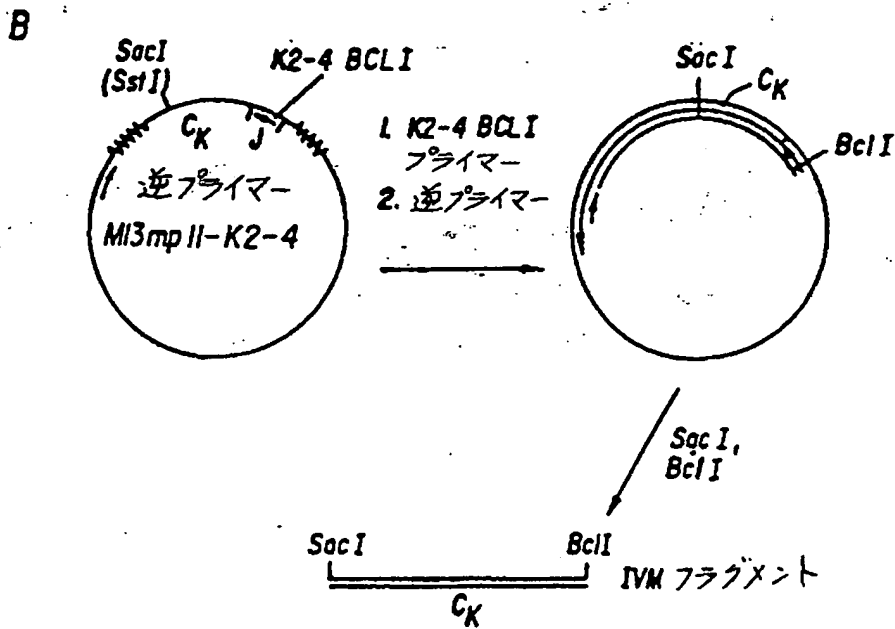
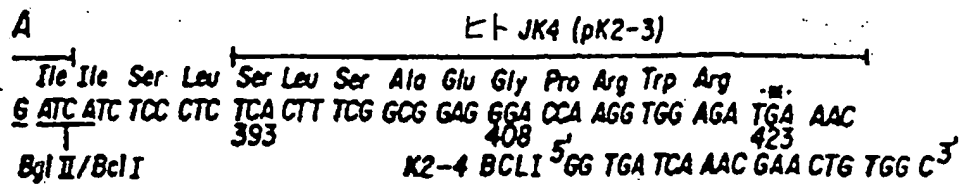


【第12B図】

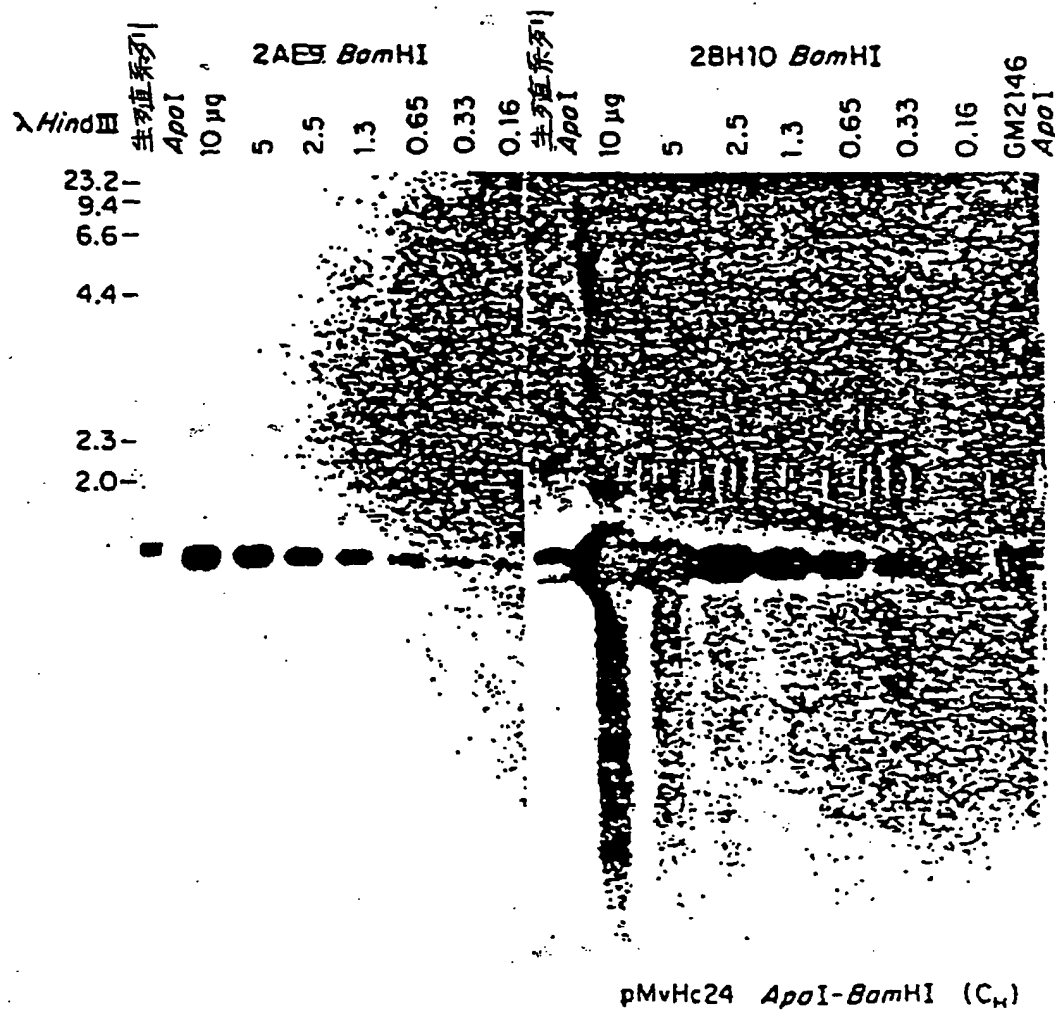
PING2006E	GGA TCC CCC ACC	ATG GGA TGG AGC TAT	ATC ATC	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Arg	Asp
PING2012E	GGA TCT GTC GAC	ATG	30	7	30	7	30	7	30	7	30	7	30
	Val His Ser Gln Val	Gln Gln Gln Pro	Gly Ala Glu Leu Val	Lys Pro Gly Ala Ser									
	GTC CAC TCC CAG GTC	CAA TTG CAG CAG CCT	GGG GCT GAA CTG	CTG	105	120	120	120	120	120	120	120	120
		75	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
	Val Lys Val Ser Cys	Lys Ala Ser Gly Tyr	Thr Phe Thr Ser Tyr	Trp MET His Trp Val									
	GTC AAG GTG TCC TCC	AAG GCC TCT GGC	TAC TAC	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
		135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135	135
	Lys Gln Arg Pro Gly	Gln Gly Leu Asp Trp	Ile Gly Glu Ile Asn Pro	Ser Asn Gly Arg									
	AAG CAG AGC CCT GCA	CAA GGC CTT GAC	TGG ATT GGA GAG ATT	AAT CCT AGC AAC GGT	CGT	240	240	240	240	240	240	240	240
		195	195	195	195	195	195	195	195	195	195	195	195
	Thr Asn Tyr Asn Glu	GAG AAG TTC AAG AGC	AAG AGC	270	270	270	270	270	270	270	270	270	270
	ACT AAT TAC AAT	255	255	255	255	255	255	255	255	255	255	255	255
		62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62
	Thr Ala Tyr MET Gln	Leu Ser Ser Leu Thr	Ser Glu Asp Ser Ala Val	Tyr Tyr Cys Ala									
	ACA GCC TAC ATG CAA	CTC AGC AGC CTG	ACA TCT GAG GAC TCT	GCG GTC TAT TAC TGT	GCC	360	360	360	360	360	360	360	360
		315	315	315	315	315	315	315	315	315	315	315	315
		82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82
	Ser Tyr Asp Tyr Asp	GAC TGG TTT GCT TAC	TGG GGC CAA GGG ACT	CTG GTC ACC GTC TCC	TCA	420	420	420	420	420	420	420	420
	TCC TAT GAT TAC	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375	375
		102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102	102
		117*	117*	117*	117*	117*	117*	117*	117*	117*	117*	117*	117*

BS/II

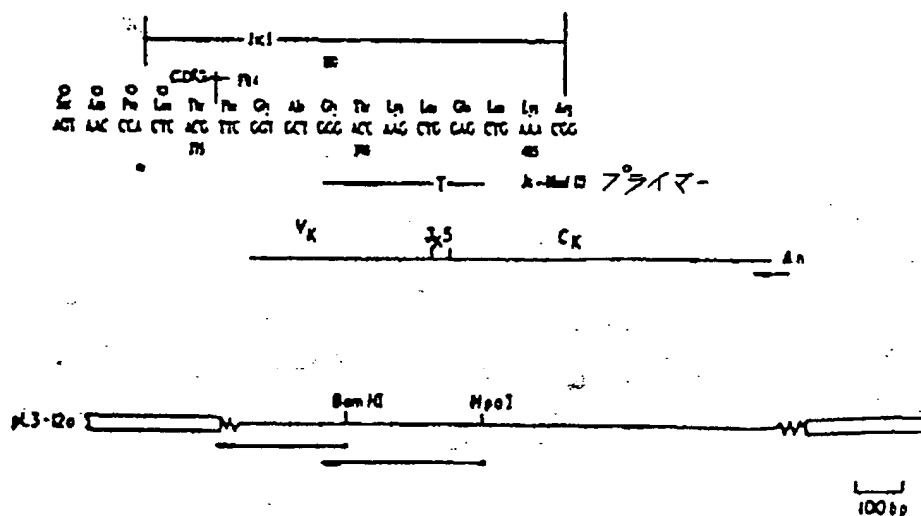
【第13図】



【第14図】



NG ATC CCC CCC CCC CCC CCC CAG TTT GTC TTA AGC CAC CAC TTA ACC CAA GTC TTA CAC ATC ATG GAT TCG CTG TCG AAC TTG
 5 38 45 58
 MET Asp Tyr Leu Tyr Asn Leu
 ATG GAT TCG CTG TCG AAC TTG
 58 65 72 79 86 93
 CTA TTC CTG ATG GCA GGT GGC CAA AGT GGC CAA GCA CAG ATC CAG TTG GTC CAG TCT GCA GCT CAG CTG CAG AAC GAT GGT GCA CAG ACA GTC
 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101 108 115 122 129 136 143 150 157 164 171 178 185 192 199 206 213 220 227 234 241 248 255 262 269 276 283 290 297 304 311 318 325 332 339 346 353 360 367 374 381 388 395 402 409 416 423 430 437 444 451 458 465 472 479 486 493 500 507 514 521 528 535 542 549 556 563 570 577 584 591 598 605 612 619 626 633 640 647 654 661 668 675 682 689 696 703 710 717 724 731 738 745 752 759 766 773 780 787 794 801 808 815 822 829 836 843 850 857 864 871 878 885 892 900 907 914 921 928 935 942 949 956 963 970 977 984 991 998
 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101 108 115 122 129 136 143 150 157 164 171 178 185 192 199 206 213 220 227 234 241 248 255 262 269 276 283 290 297 304 311 318 325 332 339 346 353 360 367 374 381 388 395 402 409 416 423 430 437 444 451 458 465 472 479 486 493 500 507 514 521 528 535 542 549 556 563 570 577 584 591 598 605 612 619 626 633 640 647 654 661 668 675 682 689 696 703 710 717 724 731 738 745 752 759 766 773 780 787 794 801 808 815 822 829 836 843 850 857 864 871 878 885 892 900 907 914 921 928 935 942 949 956 963 970 977 984 991 998
 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101 108 115 122 129 136 143 150 157 164 171 178 185 192 199 206 213 220 227 234 241 248 255 262 269 276 283 290 297 304 311 318 325 332 339 346 353 360 367 374 381 388 395 402 409 416 423 430 437 444 451 458 465 472 479 486 493 500 507 514 521 528 535 542 549 556 563 570 577 584 591 598 605 612 619 626 633 640 647 654 661 668 675 682 689 696 703 710 717 724 731 738 745 752 759 766 773 780 787 794 801 808 815 822 829 836 843 850 857 864 871 878 885 892 900 907 914 921 928 935 942 949 956 963 970 977 984 991 998
 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101 108 115 122 129 136 143 150 157 164 171 178 185 192 199 206 213 220 227 234 241 248 255 262 269 276 283 290 297 304 311 318 325 332 339 346 353 360 367 374 381 388 395 402 409 416 423 430 437 444 451 458 465 472 479 486 493 500 507 514 521 528 535 542 549 556 563 570 577 584 591 598 605 612 619 626 633 640 647 654 661 668 675 682 689 696 703 710 717 724 731 738 745 752 759 766 773 780 787 794 801 808 815 822 829 836 843 850 857 864 871 878 885 892 900 907 914 921 928 935 942 949 956 963 970 977 984 991 998
 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101 108 115 122 129 136 143 150 157 164 171 178 185 192 199 206 213 220 227 234 241 248 255 262 269 276 283 290 297 304 311 318 325 332 339 346 353 360 367 374 381 388 395 402 409 416 423 430 437 444 451 458 465 472 479 486 493 500 507 514 521 528 535 542 549 556 563 570 577 584 591 598 605 612 619 626 633 640 647 654 661 668 675 682 689 696 703 710 717 724 731 738 745 752 759 766 773 780 787 794 801 808 815 822 829 836 843 850 857 864 871 878 885 892 900 907 914 921 928 935 942 949 956 963 970 977 984 991 998
 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101 108 115 122 129 136 143 150 157 164 171 178 185 192 199 206 213 220 227 234 241 248 255 262 269 276 283 290 297 304 311 318 325 332 339 346 353 360 367 374 381 388 395 402 409 416 423 430 437 444 451 458 465 472 479 486 493 500 507 514 521 528 535 542 549 556 563 570 577 584 591 598 605 612 619 626 633 640 647 654 661 668 675 682 689 696 703 710 717 724 731 738 745 752 759 766 773 780 787 794 801 808 815 822 829 836 843 850 857 864 871 878 885 892 900 907 914 921 928 935 942 949 956 963 970 977 984 991 998
 10 17 24 31 38 45 52 59 66 73 80 87 94 101 108 115 122 129 136 143 150 157 164 171 178 185 192 199 206 213 220 227 234 241 248 255 262 269 276 283 290 297 304 311 318 325 332 339 346 353 360 367 374 381 388 395 402 409 416 423 430 437 444 451 458 465 472 479 486 493 500 507 514 521 528 535 542 549 556 563 570 577 584 591 598 605 612 619 626 633 640 647 654 661 668 675 682 689 696 703 710 717 724 731 738 745 752 759 766 773 780 787 794 801 808 815 822 829 836 843 850 857 864 871 878 885 892 900 907 914 921 928 935 942 949 956 963 970 977 984 991 998

[illegible]

【第17図】

Fig.17a

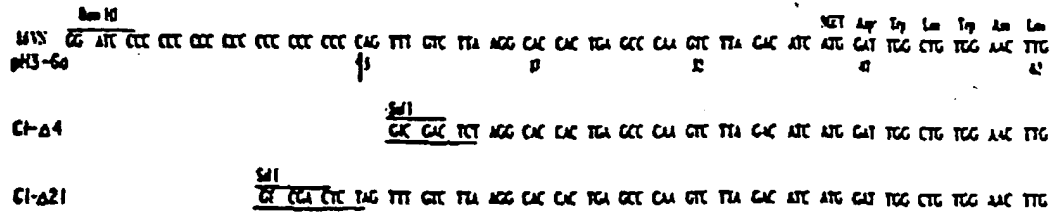


Fig.17b

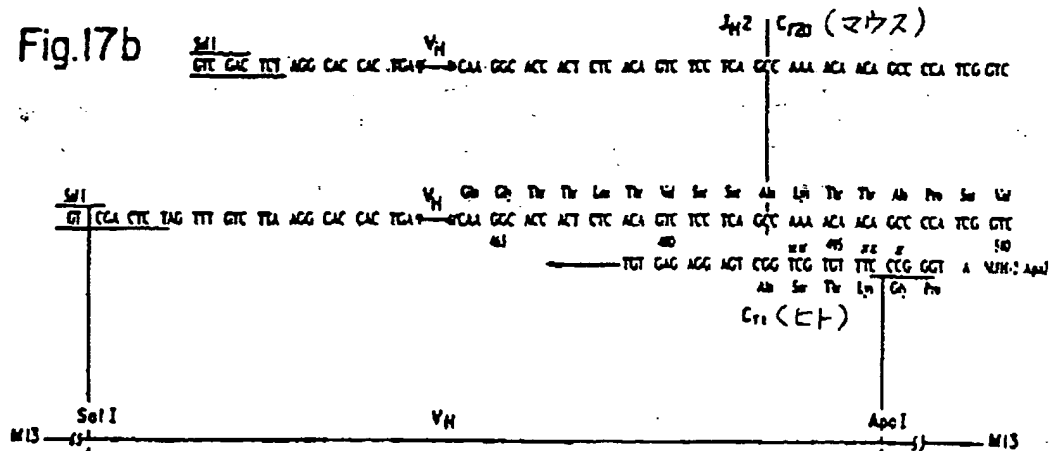
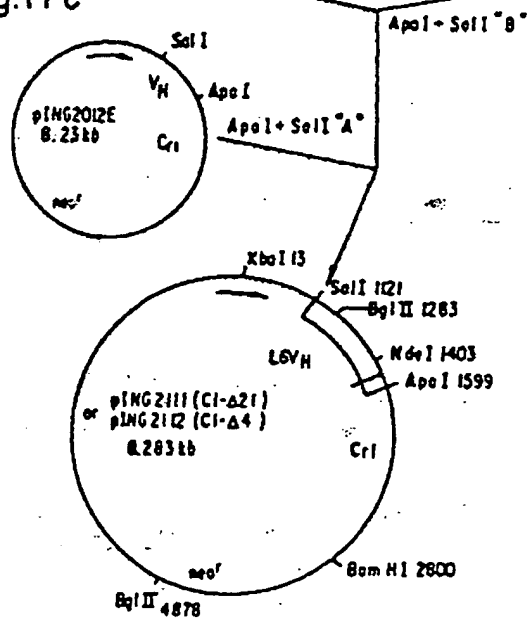
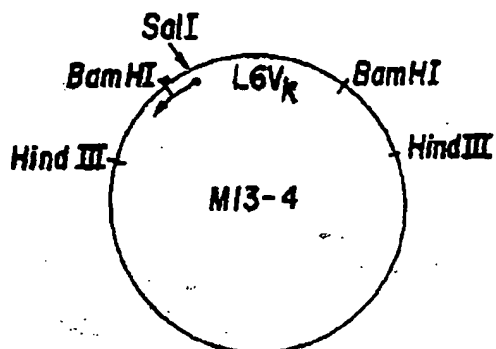
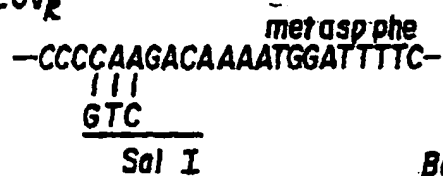


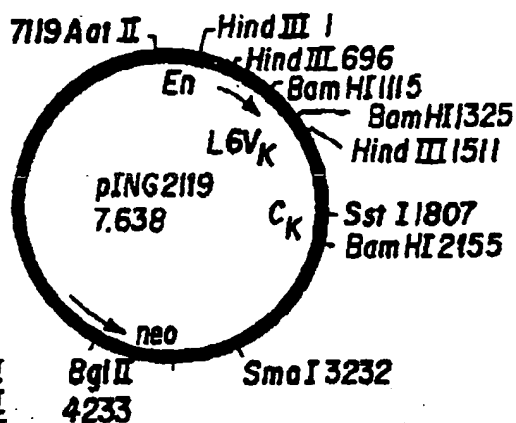
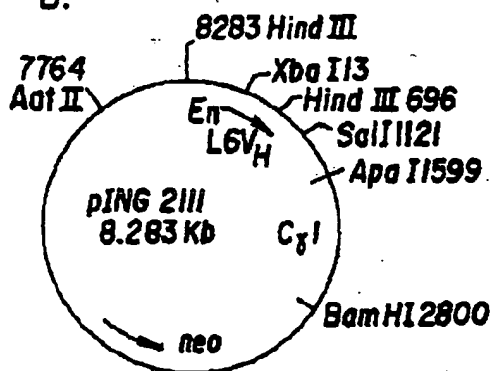
Fig.17c



【第19図】

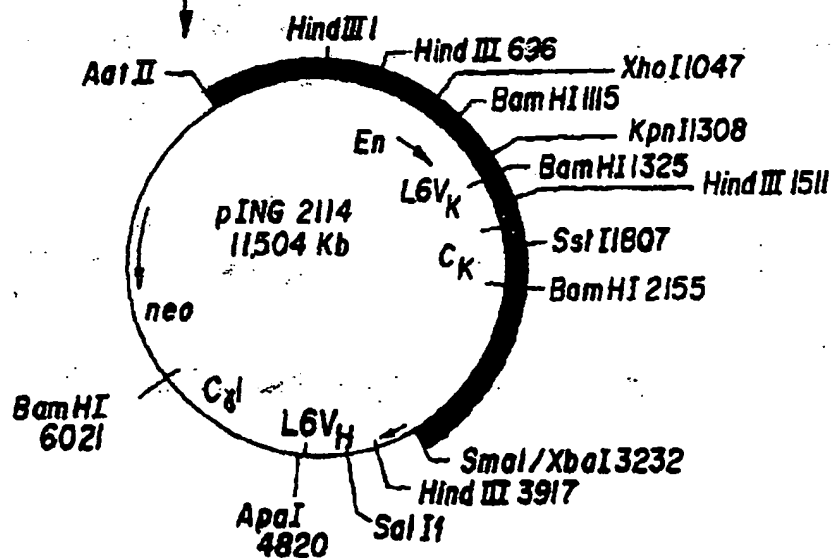
A. 5' L6V_K

B.



1. Xba I
 2. Klenow pol I
 3. Aot II
 "A"

1. Aot II
 Smo I
 Bgl II
 "A"



16 千×口工

Sall PvuII 301 PvuII 312

GTCGACTCTAGTTTGTCTTAAGGCCCACTCAGCCACG

 nse

TCTTAGACATCATGGAT

ポイント ACCACTCTCAACAGTCCTCTCA | GGCAGCACAAGGCGC
 AAT
 CCAAT

1' ^{Sall} ^{Not} GTO GAC AAA ATG GAT p104 2150 gpc

コード ACC AAG CT⑦ GAG ④ TGA AAA | CGA ACT

207 7X01

5' ⁵¹¹
1 ^{MC}
GTCGACATCGGA

ジョイント $\overset{20, 10}{ACG} \overset{10, 10}{GTC} \overset{10, 10}{ACC} \overset{10, 10}{GTC} \overset{10, 10}{TCT} \overset{10, 10}{TCA} | \overset{10, 10}{GCC} \overset{10, 10}{TCC}$

511
1
GTC GAC AAA ATG GAT

シヨウト ^{no, his} ACC AAG CT T GAG A TGA AAA | ^{C₄} CGA ACT

【第21図】

2H7 重鎖可変区乙列

11-9-

met gly phe ser arg ile phe
 C₃₃GTACCTCTCTACAGTCCCTGAAGACACTGACTCTAACCATG GGA TTC AGC AGG ATC TTT

へ°フ°4ト°

MCS1

FR1

leu phe leu leu ser val thr thr gly val his ser gln ala tyr leu gln
 CTC TTC CTC CTC TCA GTA ACT ACA GGT GTC CAC TCC CAG GCT TAT CTA CAG

gln ser gly ala glu leu val arg pro gly ala ser val lys met ser cys
 CAG TCT GGG GCT GAG CTG GTG AGC CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATC TCC TGC

FR1 | CDR1

CDR1 | FR2

lys ala ser gly tyr thr phe thr ser tyr asn met his trp val lys gln
 AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC AAT ATG CAC TGG GTA AAG CAG

FR2 | CDR2

thr pro arg gln gly leu glu trp ile gly ala ile tyr pro gly asn gln
 ACA CCT AGA CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCA GGA AAT GGT

CDR2 | FR3

asp thr ser tyr asn gln lys phe lys gly lys ala thr leu thr val asp
 GAT AGT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GTA GAC

lys ser ser ser thr ala tyr met gln leu ser ser leu thr ser glu asp
 AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAA GAC

FR3 | CDR3

ser ala val tyr phe cys ala arg val val tyr tyr ser asn ser tyr trp
 TCT GCG GTC TAT TTC TGT GCA AGA GTG GTG TAC TAT AGT AAC TCT TAC TGG

CDR3 | FR4

FR4

FR2

tyr phe asp val trp gly thr gly thr thr val thr val ser
 TAC TTC GAT GTC TGG GGC ACA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCG₃₀

MCS1

FR1:FR2 プライマー

【第22図】

287 鎖鎖可変領域

リ-ダ-ハ°フ°4ト°

met asp phe gln val gln ile phe ser phe leu leu
 C₂₃CCCAAAATTCAAAGACAAATG GAT TTT CAA GTG CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA
 —GTC— Sall フライマー

ile ser ala ser val ile ile ala arg gly gln ile val leu ser gln ser
 ATC AGT GCT TCA GTC ATA ATT GCC AGA GGA CAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT

pro ala ile leu ser ala ser pro gly glu lys val thr met thr cys arg
 CCA GCA ATC CTC TCT GCA TCT CCA GGC GAG AAG GTC ACA ATC ACT TGC AGG

ala ser ser ser val ser tyr met his trp tyr gln gln lys pro gly ser
 GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG CAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA TCC

ser pro lys pro trp ile tyr ala pro ser asn leu ala ser gly val pro
 TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT GCC CCA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT

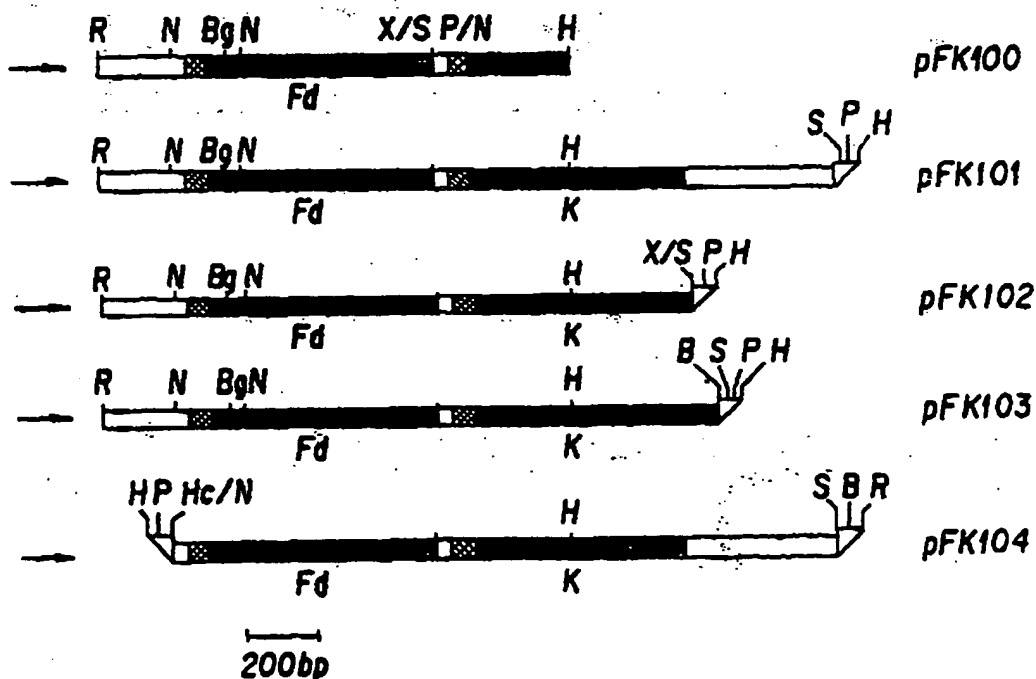
ala arg phe ser gly ser gly ser gly thr ser tyr ser leu thr ile ser
 GCT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGC ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC

arg val glu ala glu asp ala ala thr tyr tyr cys gln gln trp ser phe
 AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT TTT

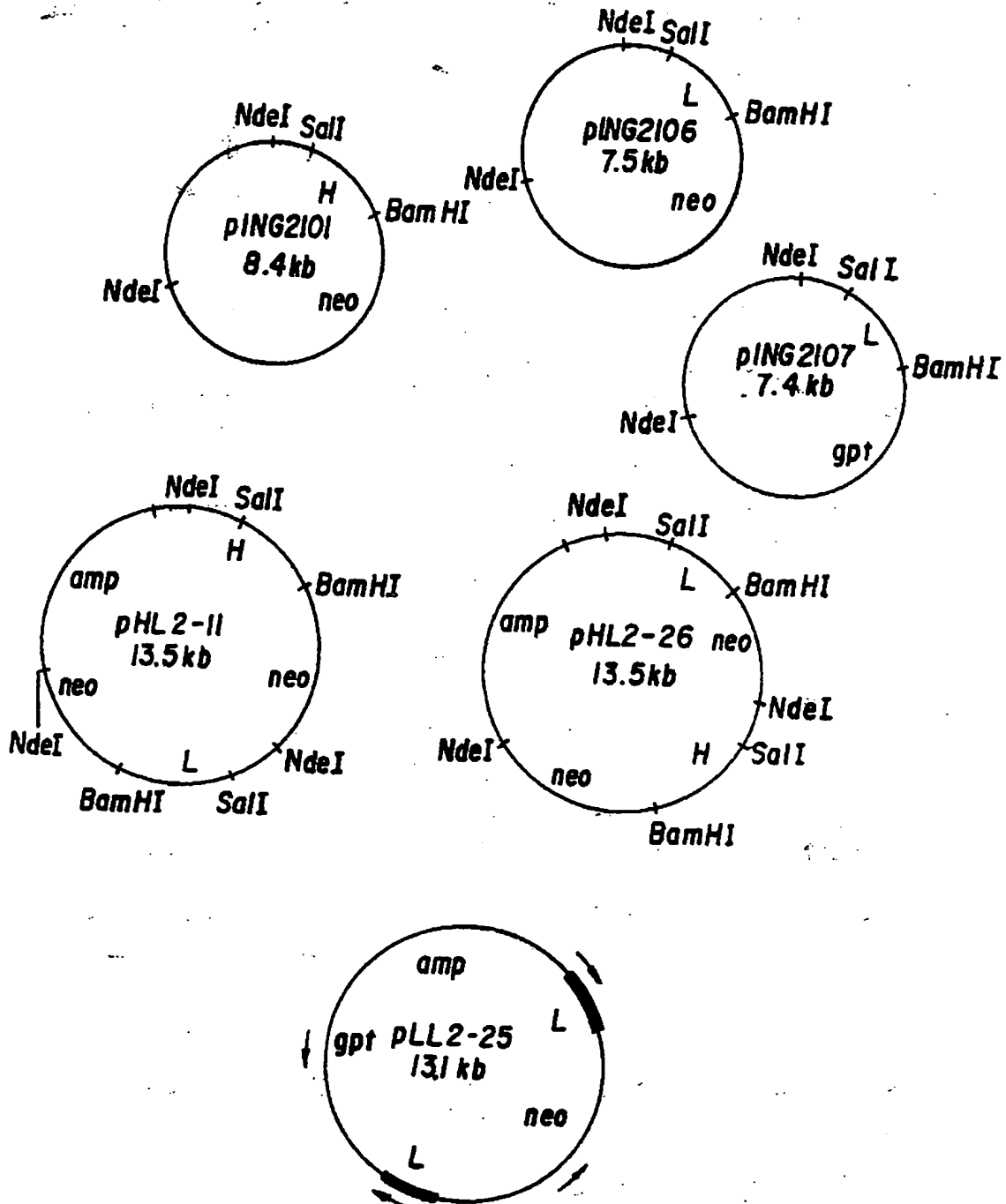
asn pro pro phe gly ala gly thr lys leu glu leu lys
 AAC CCA CCC ACC TTC GGT GCT GGG ACC AAG CTG CAG CTG AAA

XbaI フライマー

【第39図】

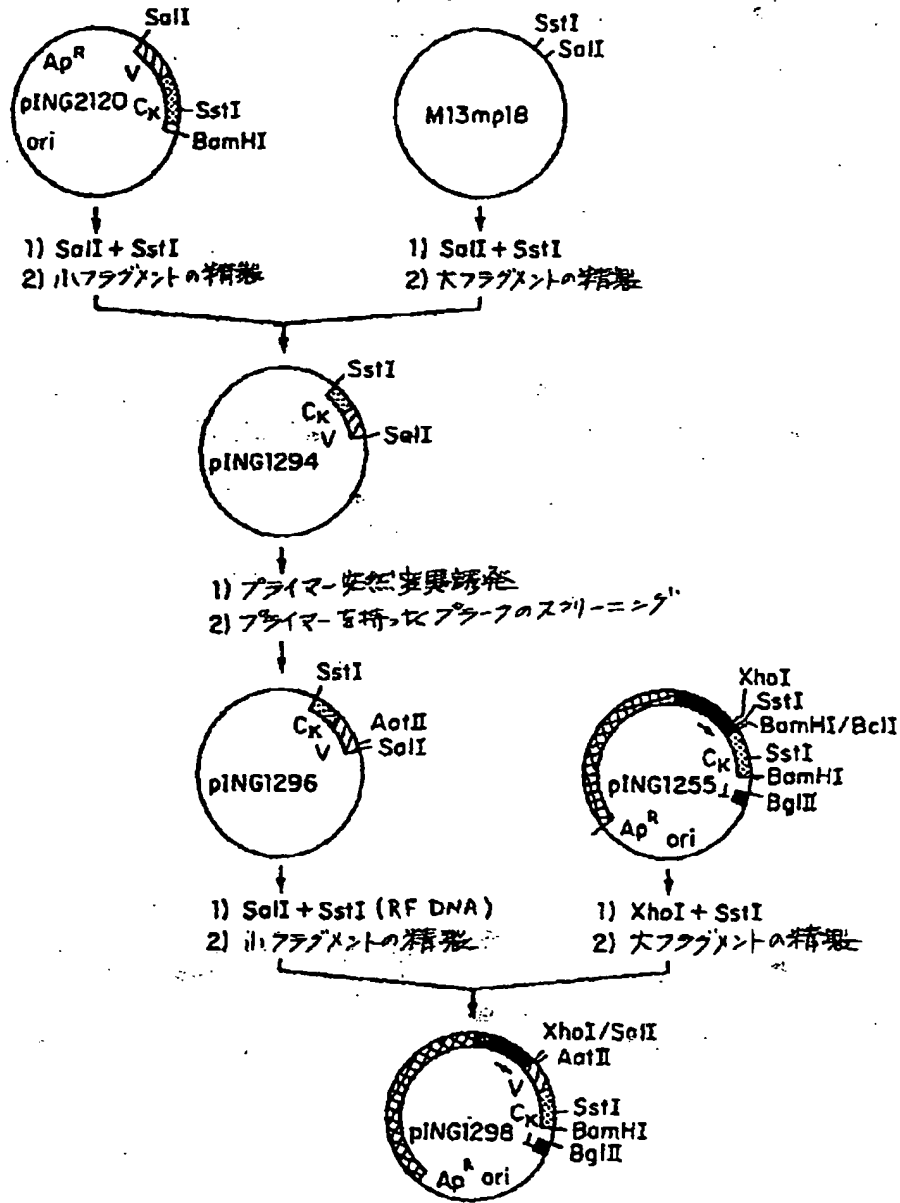


【第23図】



【第25図】

A



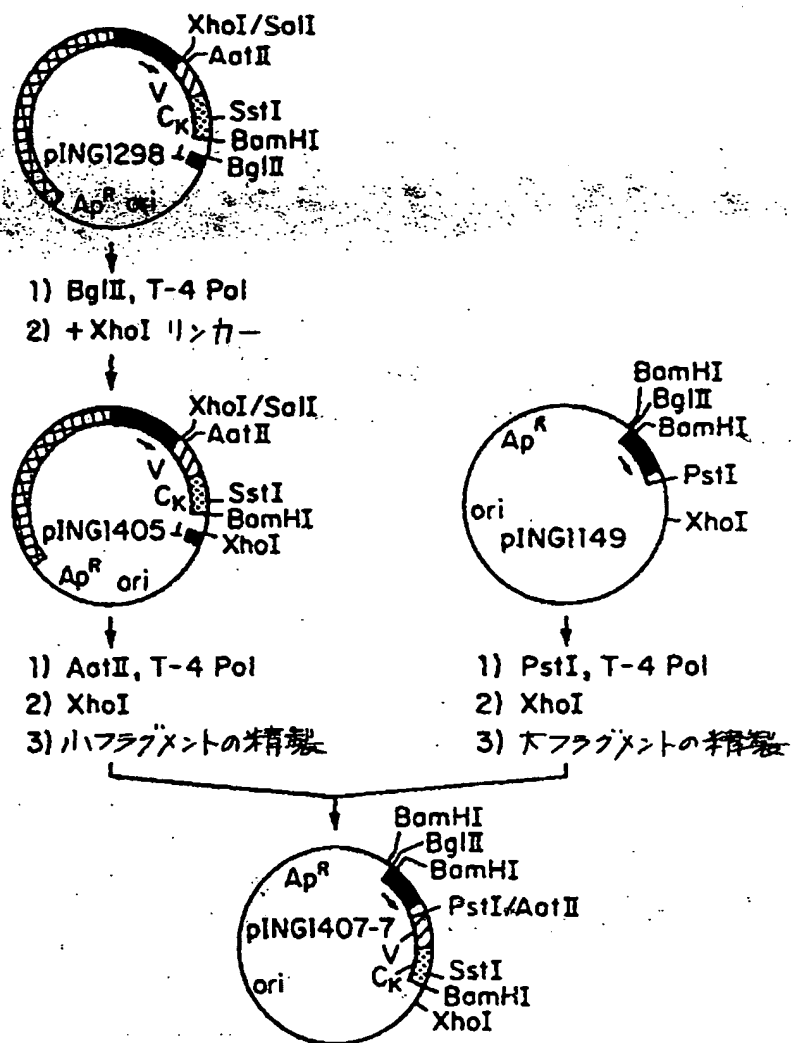
B

シグナル配列
プロセッシング部位

UT Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val Ile MET Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala
 TG GAT TTT CAA GTC CAG ATT TTC AGC TTC CTG CTA ATC ACT GGT TCA GTC ATA ATG TCC AGA TGA CAA ATT GTT CTC TCC CAG TGT CCA GCA
 3' ATA ATG TCC AGA TGT CAA ATT GTT 5'

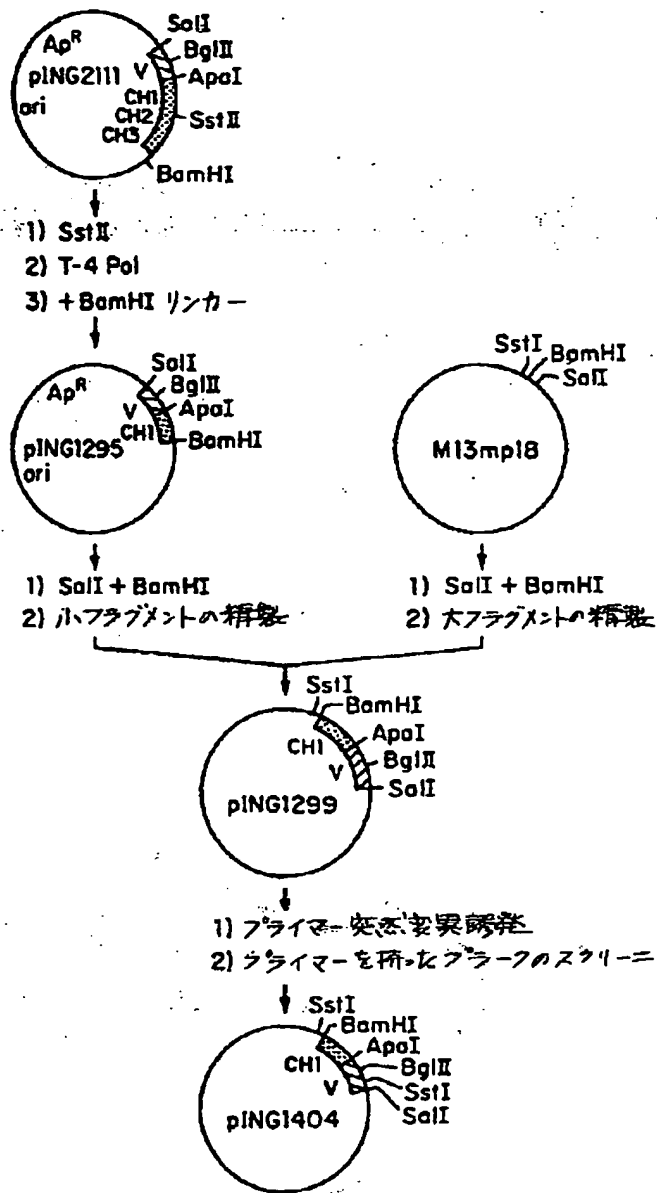
AATII

C



【第26図】

A



B

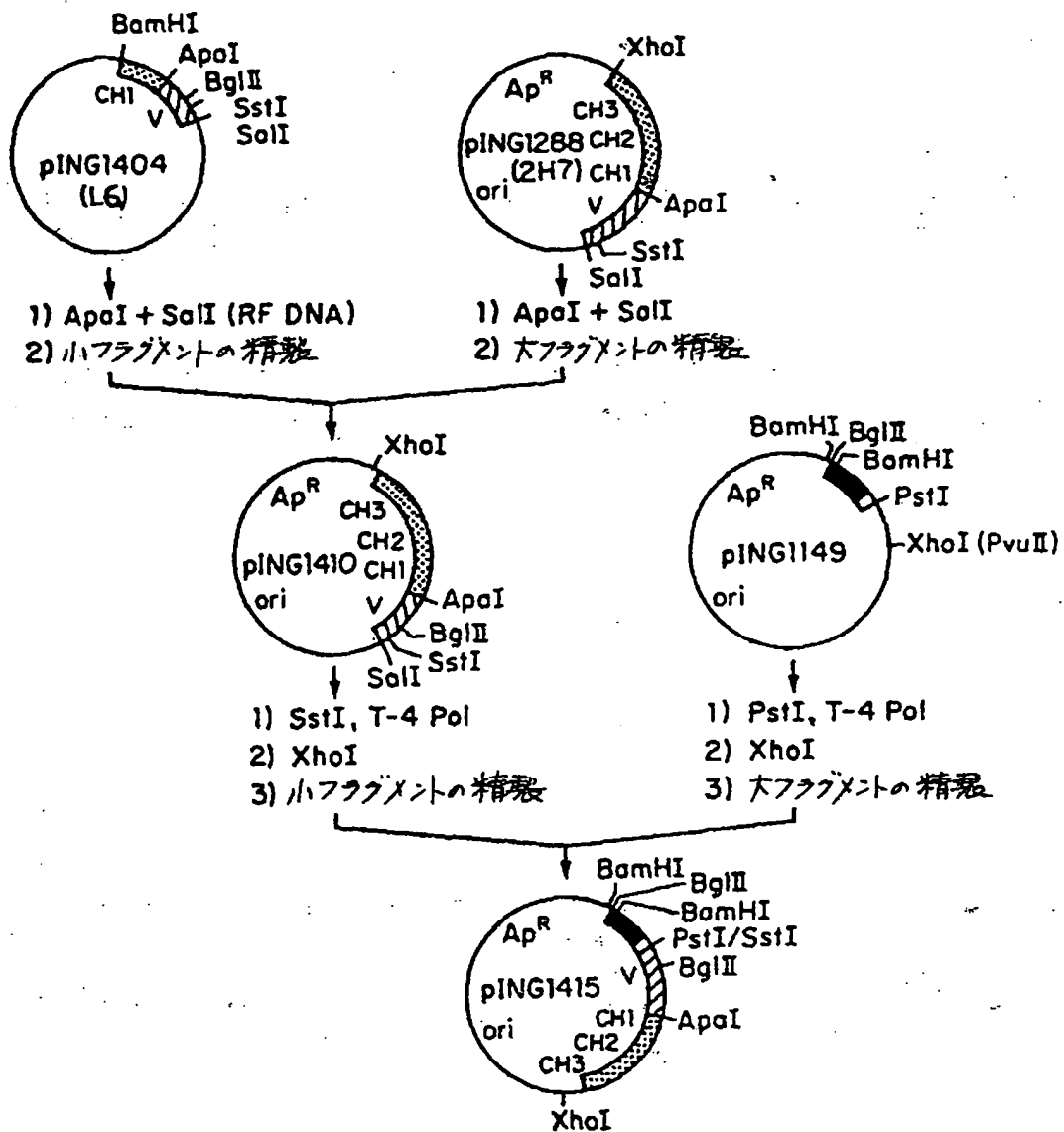
シグナル配列
プロセッシング部位

↓

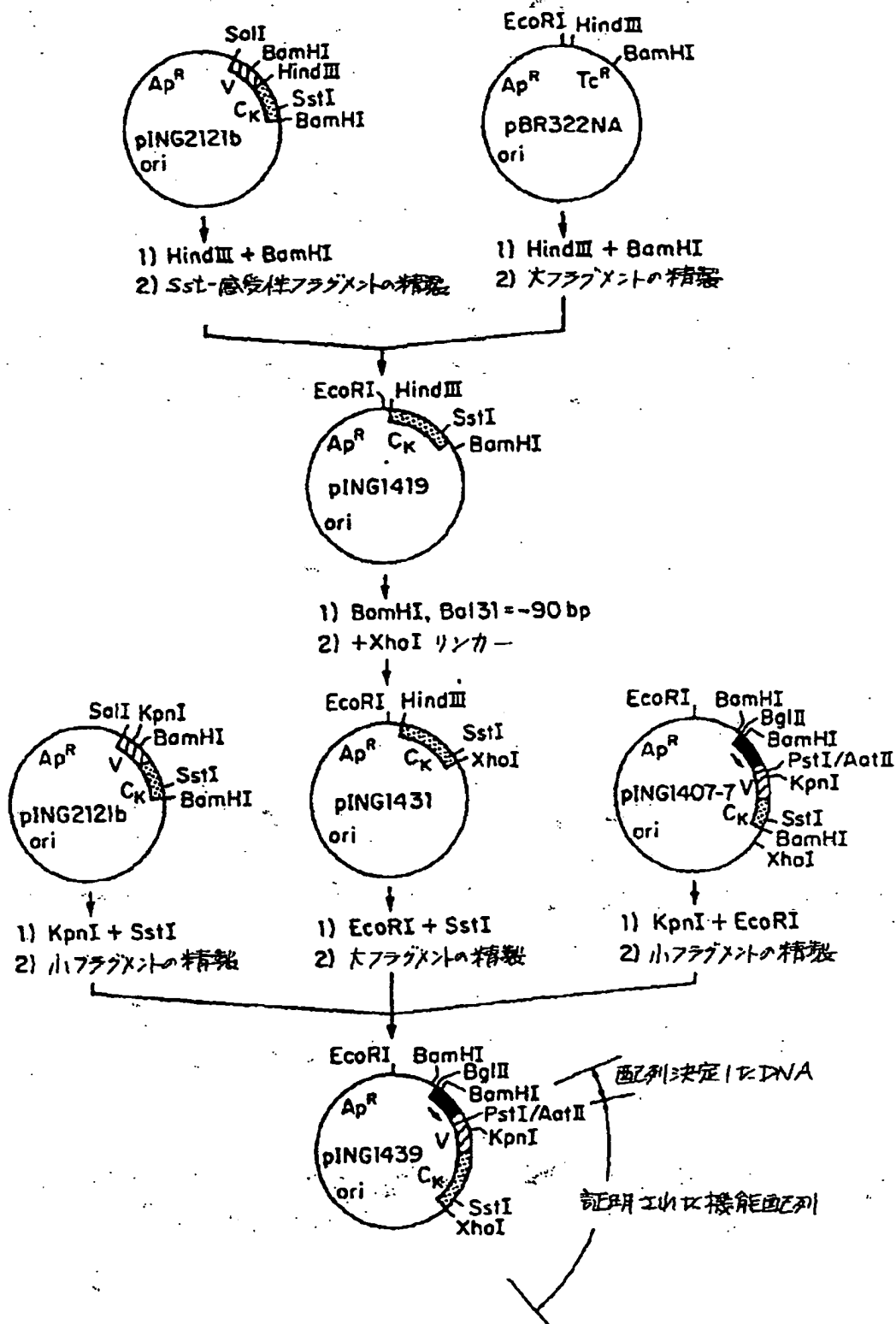
NET Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu MET Ala Ala Ala Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu
 ATG GAT TGG CTG TGG AAC TTG CCA TTC CTG ATG GCA GCT GCT CAA AGT GGC CAA GCA CAG ATT CAG TTG GTG CAG TCT GGA CTT GAG
 5' AA ACT GCT CCA GCT CAG ATC CAG TTG GT 3'

SstI

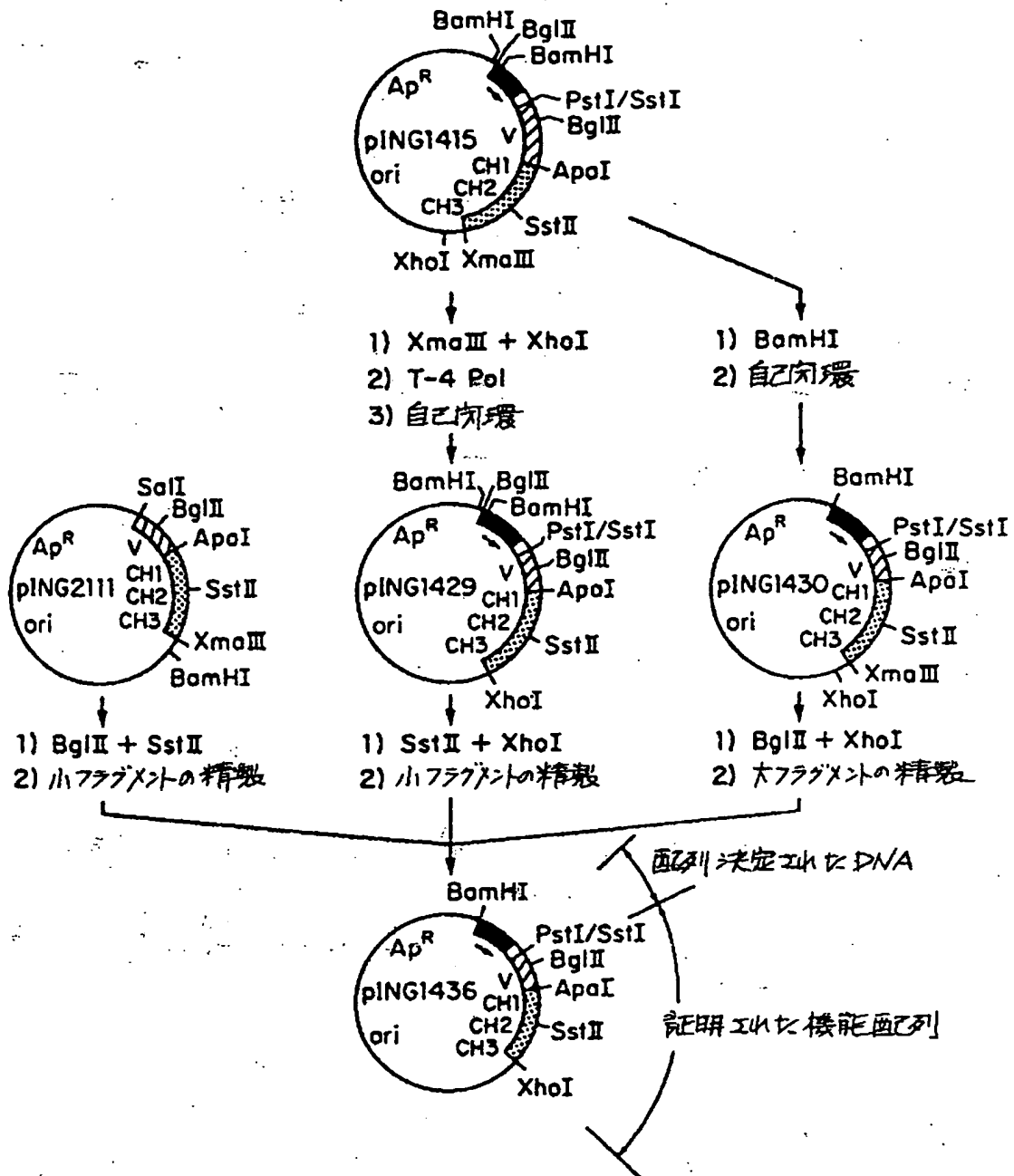
C



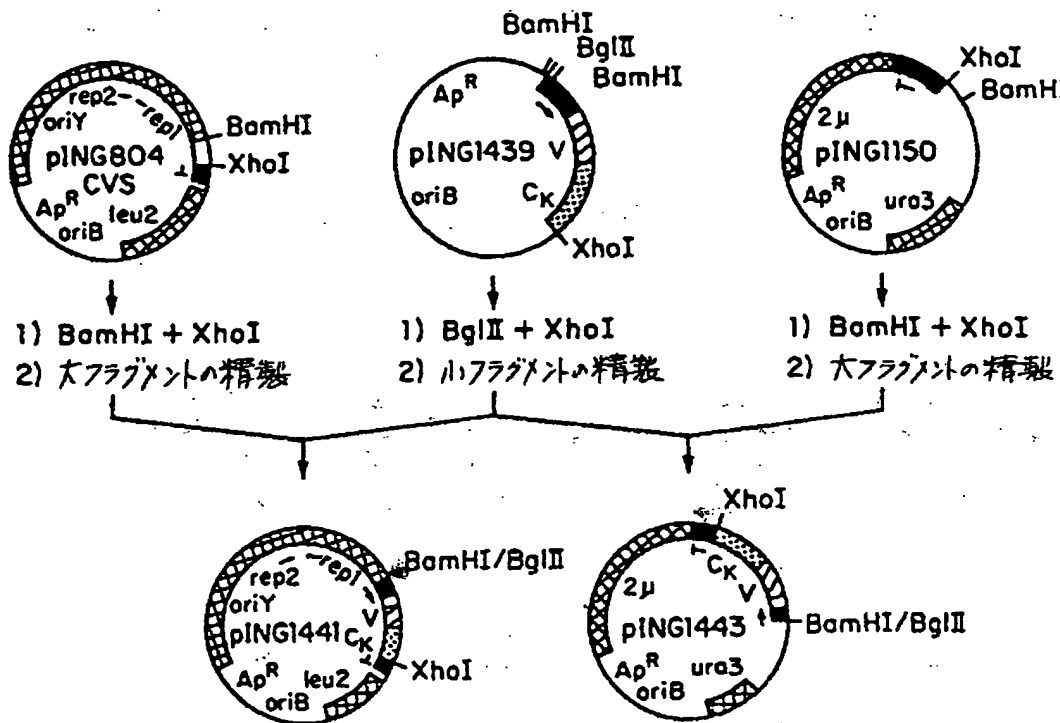
【第27図】



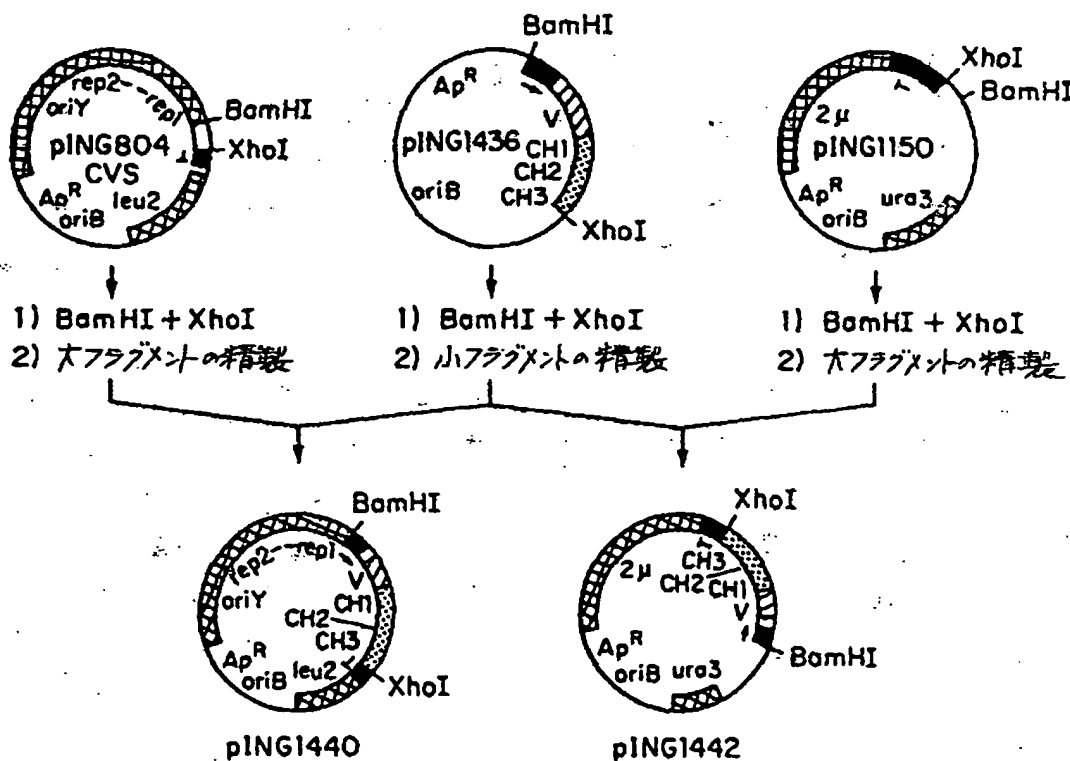
【第28図】



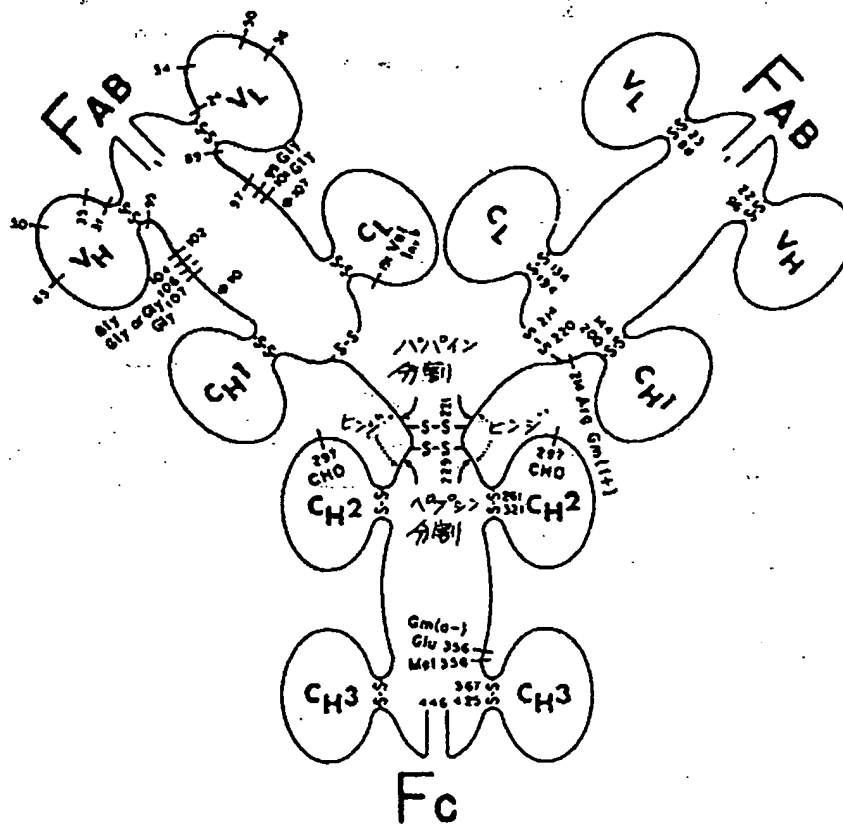
【第29図】



【第30図】

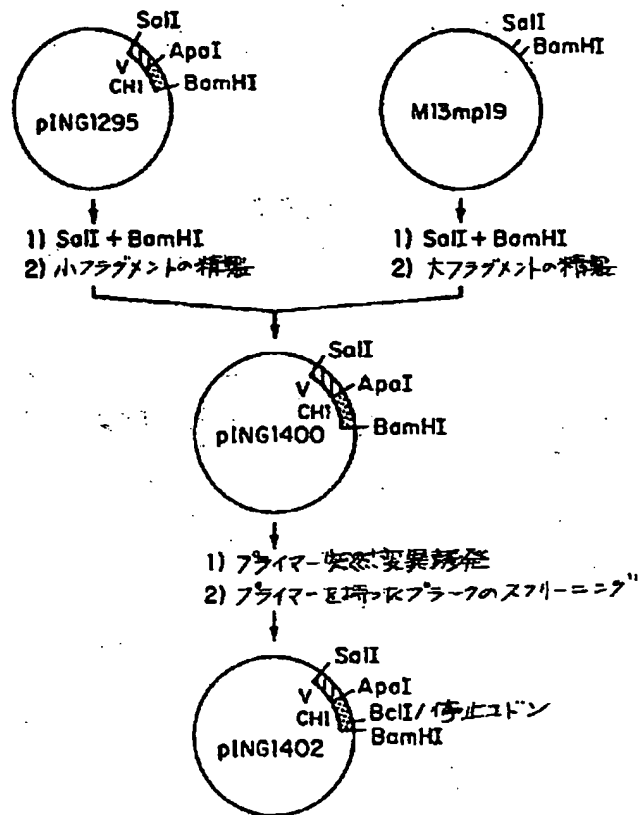


【第31図】

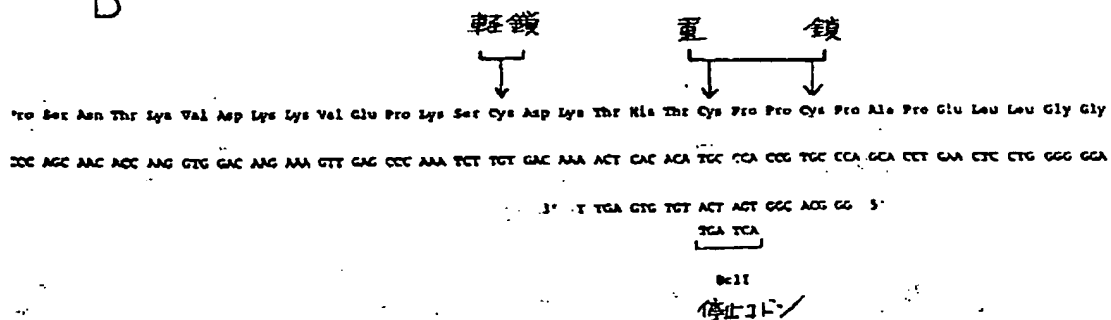


【第32図】

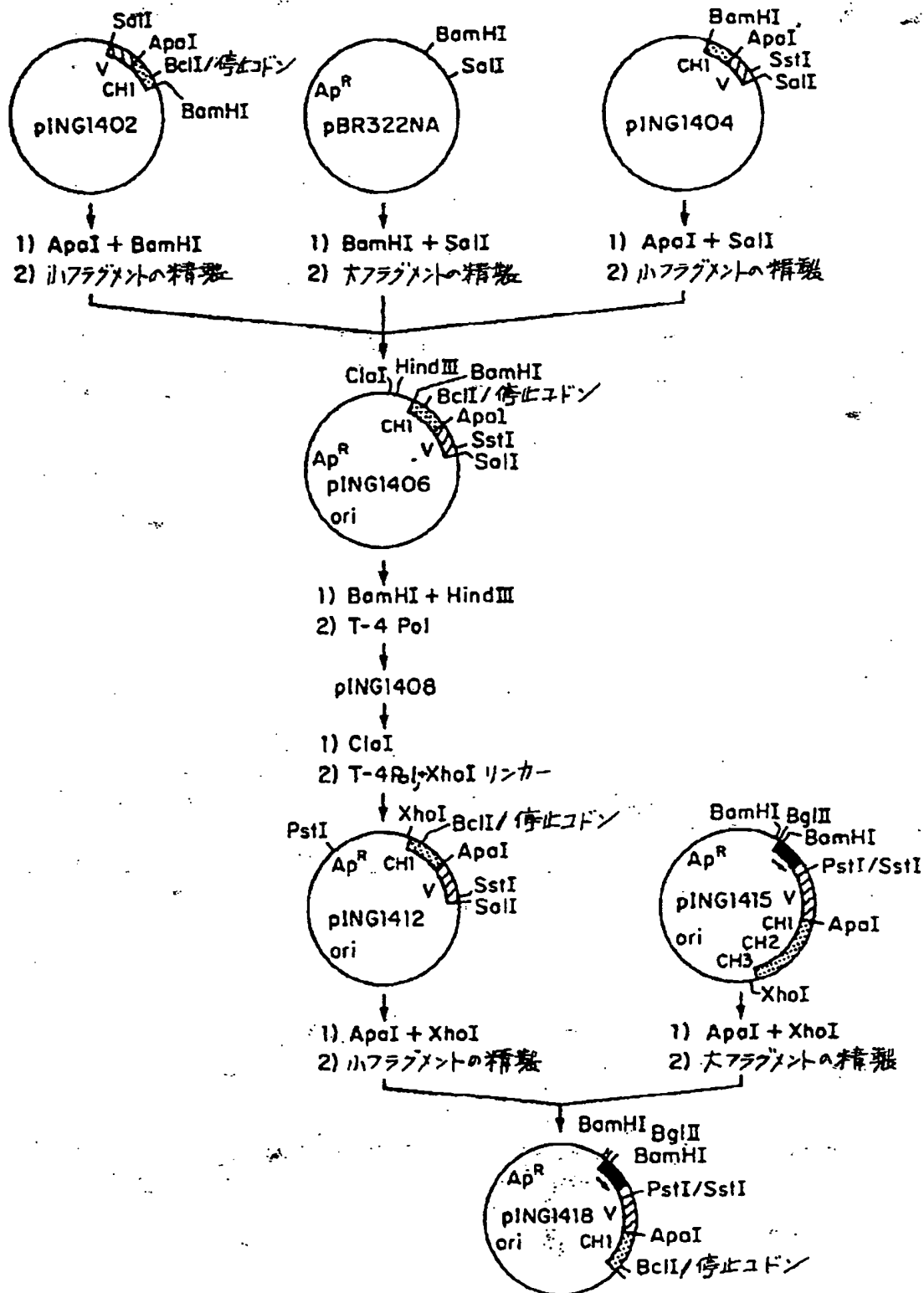
A



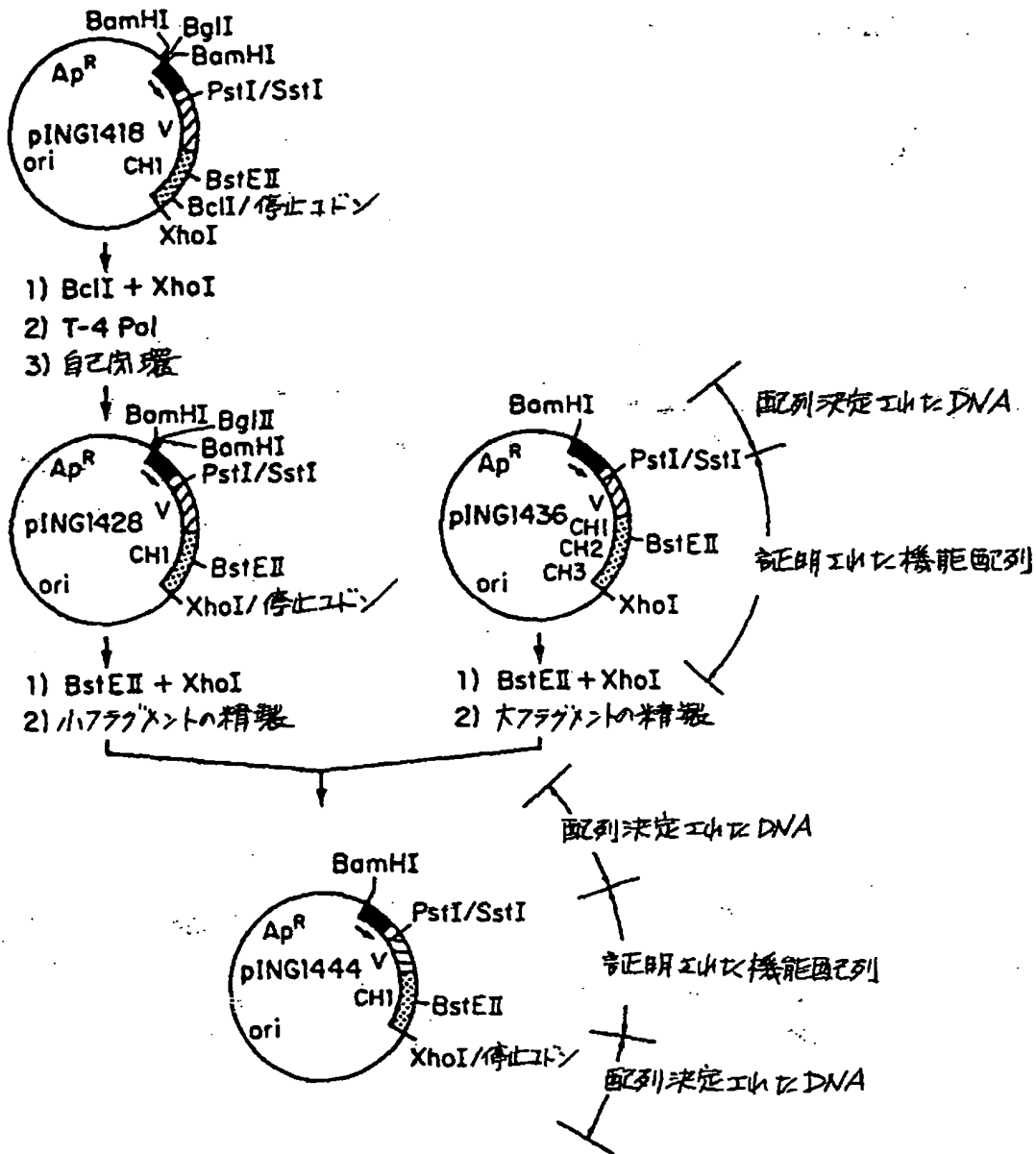
B



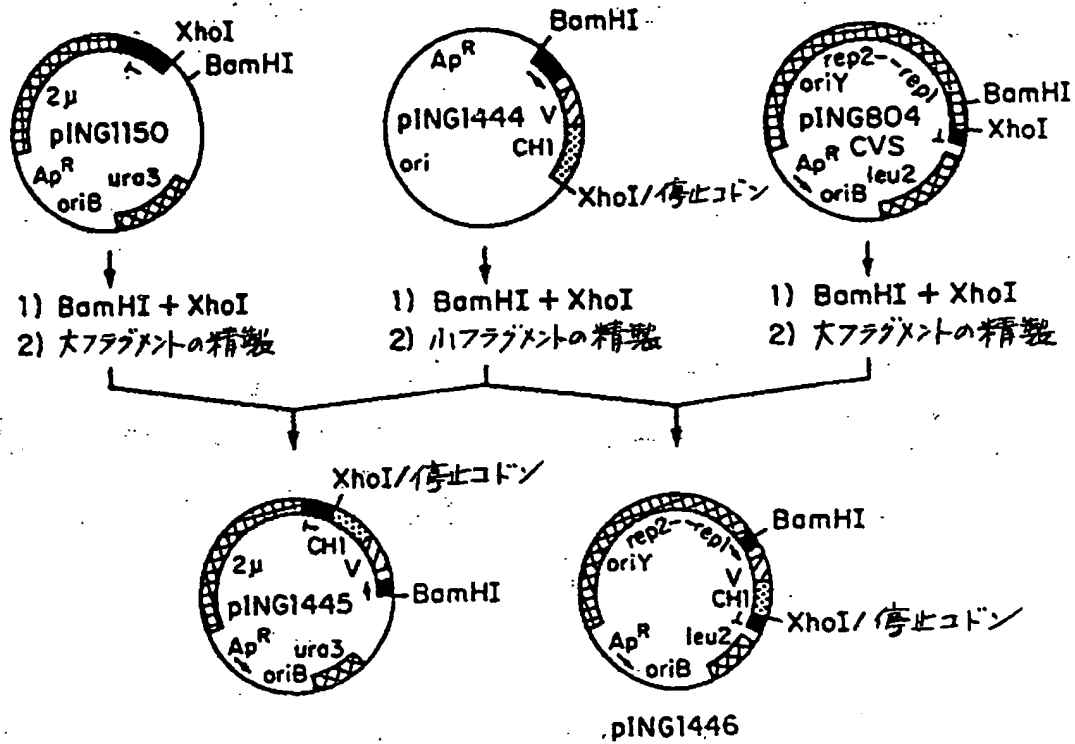
【第33図】



【第34図】



【第35図】



【第36図】

A

*Dra*I

TTT AAA AGG AAA TTT TTT CTT ATA AAA

CCC AAA TTA TCC AAT CAT CAG TAT TAC AAA ATG TTT CAA CCG TAA TAC ATT TAA CAT TTC

ACC CTT GAA CTG ATC TTA TTT TTT GAC CAC ACT CCC CTT GGT TTT TCA CCA AAA CTG AGT

*Nde*I

TTC ATT TTT GTT GAA AAA TTT GGA CCT GCG ACA TCG GGC ATA TCG AAC GAT AAA TGC CCA

1

MET Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala

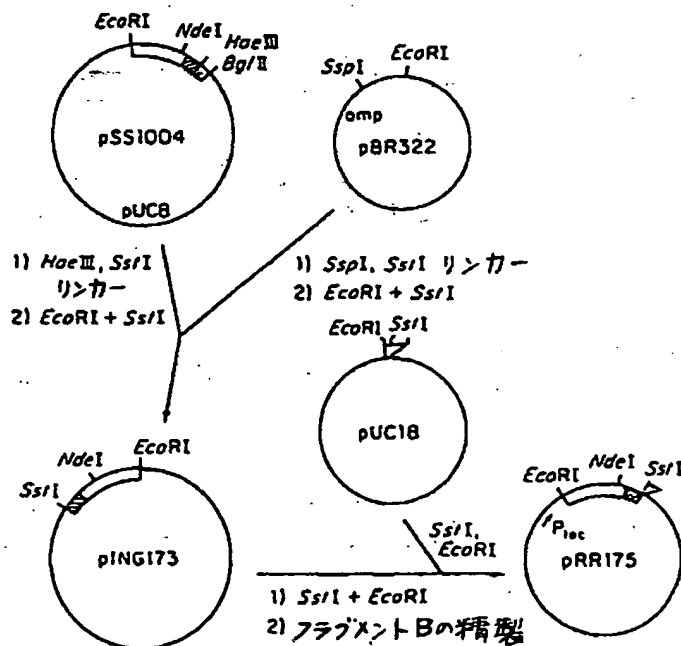
TGA AAA TTC TAT TTC AAG GAG ACA GTC ATA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT

*Hae*III

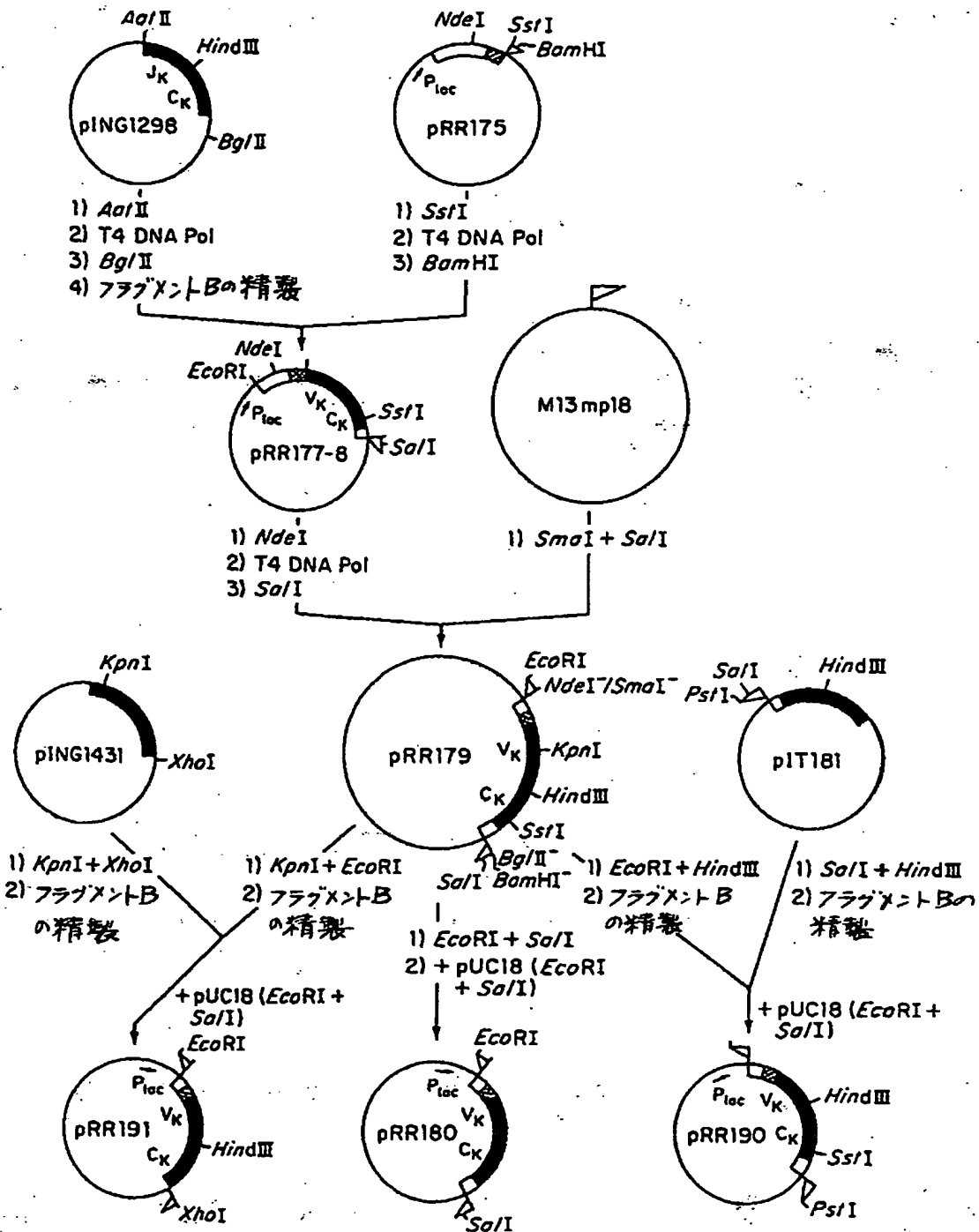
90

Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala MET Ala Ala Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr
GGA TTG TTA TTA CTC GGT GGC CAA CCA GCG ATG GCC GCA AAT ACG GGT GGC TAT GCC ACC

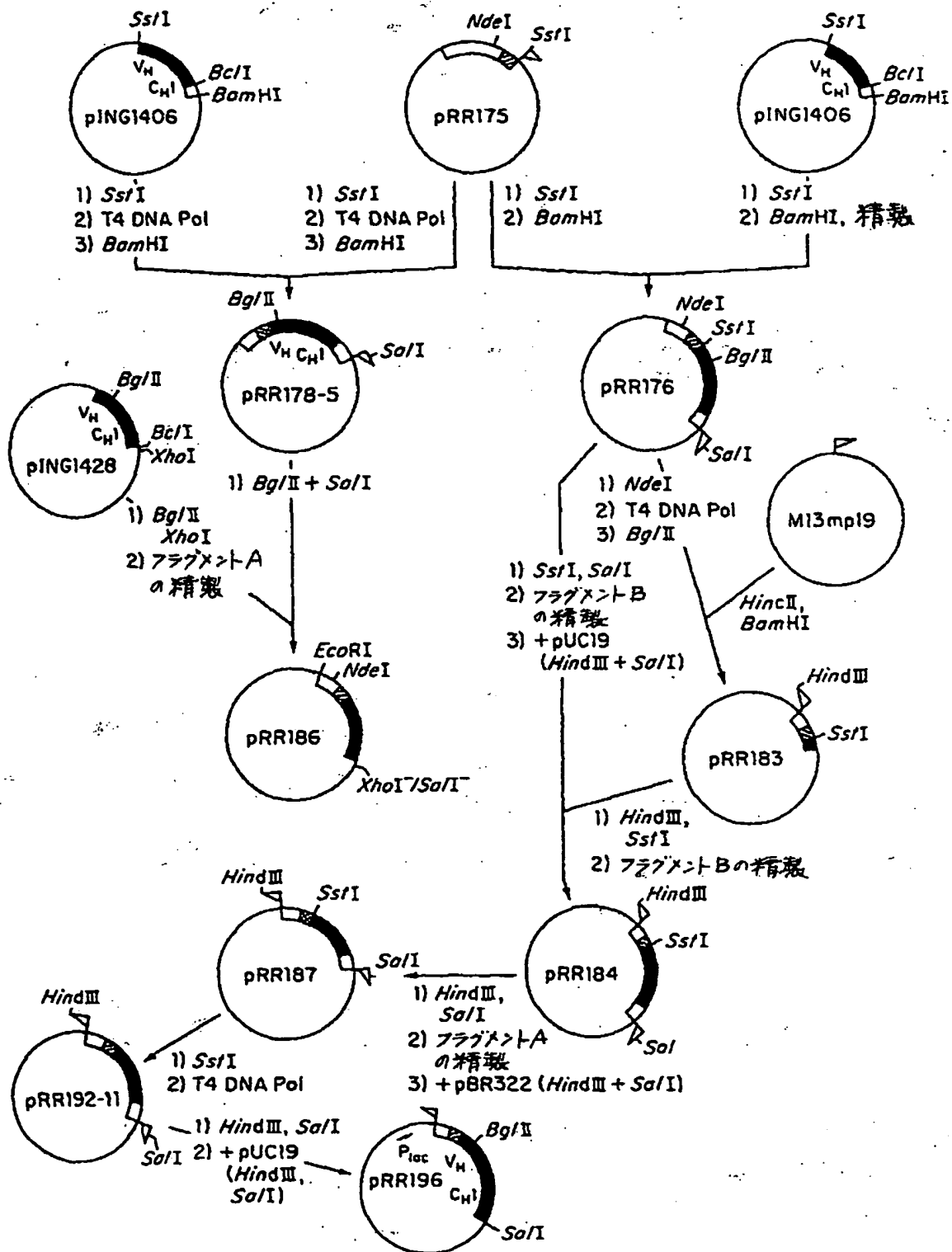
B



【第37図】

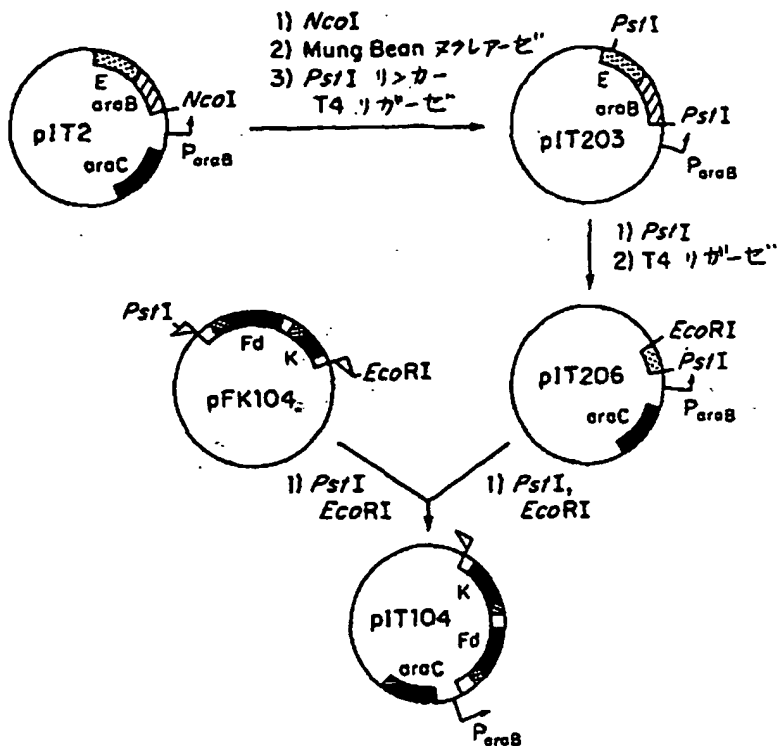


【第38図】

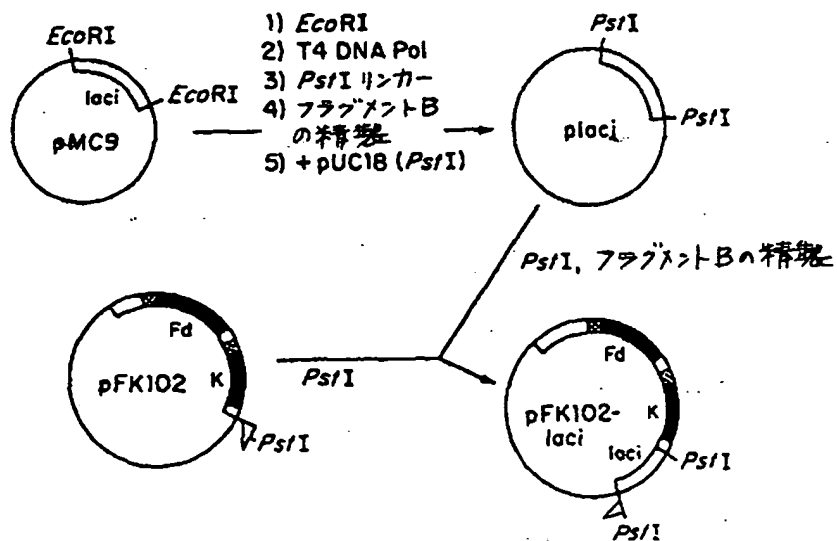


【第40図】

A



B



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

// A 61 K 39/395

A 61 K 39/395

(C 12 P 21/00)

C12R 1:19)

(C12P 21/08

C12R 1:19)

(72)発明者 ホルウィッツ, アーノルド・エイチ
アメリカ合衆国カリフォルニア90045,
ロスアンジェルス、ミッドフィールド・
アベニュー 7529番

(72)発明者 ウォール, ランドルフ
アメリカ合衆国カリフォルニア91423,
シャーマン・オークス、バン・ノード
5106番

(72)発明者 ベター, マーク
アメリカ合衆国カリフォルニア90046,
ロスアンジェルス、ゾラダ・ドライブ
2462番

(56)参考文献 国際公開87103008 (WO, A1)
欧州公開215594 (EP, A1)
J. Immunol. 137 (3)
(1986) p. 1066-1074
EMBO. J. 4 [8] (1985) p.
1911-1920
Proc. Natl. Acad. Sc
i. USA 81 (1984) p. 3273-3277
BIO/Technology 4
(1986) p. 991-995
Nature 312 (1984) p. 604-
608

(58)調査した分野(Int.Cl.⁶, DB名)
BIOSIS (DIALOG)
WPI (DIALOG)